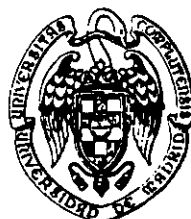


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO
FARMACOGNÓSTICO Y FARMACODINÁMICO
DE

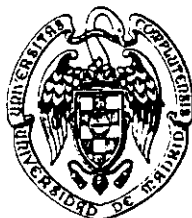
Sanguisorba minor Scop. magnolii Spach

Memoria que, para optar al grado
de Doctora en Farmacia presenta
María Jesús Rodríguez Martínez
Madrid, Mayo de 1997.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



ÁNGEL MARÍA VILLAR DEL FRESNO, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

que la Tesis Doctoral que lleva por título "CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y FARMACODINÁMICO DE *Sanguisorba minor Scop magnolii* Spach" presentada por María Jesús Rodríguez Martínez, ha sido realizada en este Departamento, bajo la dirección de la Dra. Paulina Bermejo, reuniendo todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctora en Farmacia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico se autoriza su presentación para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, a los efectos oportunos firmo el presente en Madrid, Mayo de 1997.

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser "Ángel Villar", sobre una línea horizontal.

Prof. Dr. Angel M^a Villar
Director del Departamento

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



PAULINA BERMEJO BENITO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

que la Tesis Doctoral que lleva por título "CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y FARMACODINÁMICO DE *Sanguisorba minor Scop magnolii* Spach" presentada por María Jesús Rodríguez Martínez, ha sido realizada en este Departamento, bajo su inmediata dirección y asesoramiento, reuniendo todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctora en Farmacia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico se autoriza su presentación para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, a los efectos oportunos firmo el presente en Madrid, Mayo de 1997.

Una firma manuscrita que parece decir "P. Bermejo", rodeada por un círculo y una línea horizontal.

Prof. Dra. Paulina Bermejo
Directora de la Tesis

A lo largo de estos años, han sido muchas las personas que de un modo u otro me han prestado su ayuda y colaboración. Algunas con su apoyo y ánimo, otras colaborando con sus conocimientos y en algunos casos con su ayuda material, desde la recolección, a la realización de determinadas pruebas.

La lista sería larga y seguro que incompleta, algunas incluso ya no están aquí, entre nosotros. Entre todas han conseguido que se finalizara un trabajo que de otra manera hubiera resultado estéril.

De forma especial quiero expresar mi gratitud al Dr. Ángel M^a Villar del Fresno, Catedrático-Director del Departamento de Farmacología de esta Facultad, por la confianza depositada en mí, al haber permitido que, pese al retraso, este trabajo llegara a su fin.

A la Dra. Paulina Bermejo, directora de esta Tesis, por su paciencia e inquebrantable optimismo, por su perseverancia, y sobre todo por su amistad.

Finalmente quiero agradecer a las personas que han colaborado en la elaboración de esta Memoria : a M^a José por toda su ayuda, a Ana y Marta que además han aportado su “toque artístico”, y a Manuel mi maravilloso “secretario personal”.

Todos saben que cuentan con mi agradecimiento y amistad.

A todos vosotros, quiero dedicar este trabajo.



***Sanguisorba minor* Scop.*magnolii* Spach**

A.-INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....	7
B.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
I.- ASPECTOS BOTÁNICOS DEL GÉNERO <i>Sanguisorba</i>.....	9
I.1.- SITUACIÓN TAXONÓMICA.....	9
I.2.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	10
I.3.- ECOLOGÍA	13
II.- ASPECTOS FITOQUÍMICOS	16
II.1.- REVISIÓN FITOQUÍMICA DEL GÉNERO <i>Sanguisorba</i>	16
II.1.1.- Compuestos polifenólicos.....	16
II.1.1.1.- Flavonoides	16
II.1.1.2.- Taninos.....	21
II.1.1.3.- Ácidos fenólicos	26
II.1.2.- Saponinas.....	27
II.1.3.- Otros compuestos	33
II.2.- AISLAMIENTO DE PRINCIPIOS ACTIVOS	35
II.2.1.- Técnicas cromatográficas	35
II.2.1.1.- Cromatografía en capa fina.....	37
II.2.1.2.- Cromatografía en columna.....	37
II.2.1.3.- Cromatografía líquida de alta resolución	39
II.2.1.4.- Cromatografía de gases	41
II.3.- MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL	43
II.3.1.- Espectroscopía de RMN	44
II.3.2.- Espectroscopía IR.....	46
III.- ASPECTOS FARMACOLÓGICOS	47
III.1.- APARATO DIGESTIVO	47
III.2.- HIPOGLUCEMIA.....	56

C.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
I.- PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	61
I.1.- RECOLECCIÓN	61
I.2.- DESECACIÓN.....	61
I.3.- MOLTURACIÓN.....	61
II.- ESTUDIO HISTOLÓGICO	62
II.1.- PREPARACIÓN DE LOS CORTES	62
II.2.- REACTIVOS.....	62
III.- ESTUDIO FARMACOLÓGICO.....	64
III.1.- PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS	65
III.2.- PRUEBAS SOBRE APARATO DIGESTIVO.....	66
III.2.1.- Sialorrea.....	66
III.2.2.- Úlcera.....	67
III.2.3.- Secreción gástrica	70
III.2.4.- Tránsito intestinal.....	72
III.2.5.- Constantes metabólicas.....	73
III.2.6.- Órgano aislado.....	74
III.3.- ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE.....	79
III.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	80
IV.- ESTUDIO FITOQUÍMICO.....	81
IV.1.- SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	81
IV.1.1.- Investigación cromatográfica de ácidos fenólicos	83
IV.1.2.- Investigación cromatográfica de azúcares.....	86
IV.1.3.- Investigación cromatográfica de heterósidos flavónicos	89
IV.1.4.- Investigación cromatográfica de heterósidos saponínicos.....	91
IV.1.5.- Investigación cromatográfica de aminoácidos	93
IV.1.6.- Aceite esencial.....	94
IV.2.- AISLAMIENTO DE COMPUESTOS	96
IV.2.1.- Cromatografía en capa fina.....	96
IV.2.2.- Cromatografía en columna.....	97

IV.3.- ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL: TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	98
IV.3.1.- Espectroscopía de RMN.....	98
IV.3.1.1.- ¹ H-RMN	98
IV.3.1.2.- ¹³ C-RMN	98
IV.3.2.- Espectroscopía IR.....	98
V.- ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE COMPUESTOS AISLADOS	99
D.- RESULTADOS	103
I.- ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	103
I.1.- TALLOS.....	103
I.2.- PECIOLO	105
I.3.- HOJAS	106
I.4.- FRUTO	108
I.5.- POLEN	110
II.- ESTUDIO FARMACOLÓGICO	111
II.1.- PRUEBAS SOBRE APARATO DIGESTIVO.....	111
II.1.1.- Sialorrea.....	111
II.1.2.- Actividad antiulcerosa.....	112
II.1.3.- Efecto sobre la secreción gástrica.....	115
II.1.4.- Efecto sobre el tránsito intestinal.....	116
II.1.5.- Efecto sobre constantes metabólicas.....	117
II.1.6.- Ensayos en órgano aislado	118
II.2.- ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE	120
III.- ESTUDIO FITOQUÍMICO	122
III.1.- SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR	122
III.1.1.- Investigación cromatográfica de ácidos fenólicos.....	122
III.1.2.- Investigación cromatográfica de azúcares	123
III.1.3.- Investigación cromatográfica de heterósidos flavónicos.....	126
III.1.4.- Investigación cromatográfica de heterósidos saponínicos	129

III.1.5.- Investigación cromatográfica de aminoácidos.....	130
III.1.6.- Aceite esencial	132
III.2.- AISLAMIENTO DE COMPUESTOS.....	134
III.2.1.- Cromatografía en capa fina	134
III.2.2.- Cromatografía en columna	135
III.3.- ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS	136
III.3.1.- Identificación del compuesto 1.....	136
III.3.2.- Identificación del compuesto 2.....	143
IV.- ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE COMPUESTOS AISLADOS	146
IV.1.- ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE	146
IV.2.- ENSAYOS EN ÓRGANO AISLADO	148
E.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	155
F.- CONCLUSIONES.....	165
G.- BIBLIOGRAFÍA	169

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha venido desarrollando en el mundo científico, una fuerte corriente de interés hacia las plantas medicinales como elementos terapéuticos, constituyendo la búsqueda de nuevos principios con actividad farmacológica, una línea de investigación prioritaria de numerosos centros, tanto españoles como extranjeros.

Especies cuyo uso se había prácticamente abandonado, vuelven a utilizarse; se realizan trabajos de investigación sobre plantas poco o nada estudiadas hasta este momento, para incorporarlas a la terapéutica como tales drogas, o como materia prima para la obtención de sus principios activos, o para su utilización en procesos de hemisíntesis (Shellard, 1987).

El aislamiento de sustancias de origen vegetal con actividad farmacológica, que permitan corroborar los usos populares de estas especies, constituye un amplio proyecto de investigación desarrollado en nuestro Departamento desde hace años.

Dentro de esta misma línea, se planteó el estudio de diferentes especies vegetales pertenecientes a la familia *Rosaceae*, familia que aporta numerosas plantas empleadas como medicinales, fundamentalmente en medicina popular, algunas de las cuales son consideradas como drogas oficinales.

Perteneciente a esta familia, es la *Sanguisorba minor* Scop., denominada popularmente como "hierba gitana", y sobre la que se tuvo conocimiento de que en una zona localizada de los Montes de Toledo, se usa en forma de infusión por sus propiedades tónico-digestivas. Se trata de una especie vegetal muy polimorfa, constituida por varias sub-especies de difícil diferenciación entre sí, diferenciación que no se produce en su utilización popular.

La sub-especie utilizada en la presente Memoria es la *S. minor* Scop. ssp. *magnolii* Spach, al ser la más abundante en las zonas de recolección, y sobre la que se tenía un conocimiento más directo de sus usos populares.

Las indagaciones realizadas a nivel rural en esta zona, permitieron comprobar que esta planta es utilizada desde antiguo por sus propiedades terapéuticas como astringente, carminativo, digestivo y hemostático. Sin embargo, en la literatura científica, no aparecen reseñados estudios acerca de esta especie vegetal en concreto.

Dentro de la línea de investigación prioritaria, establecida en el Departamento sobre el aislamiento de principios activos a partir de especies medicinales, se aborda el estudio fitoquímico y farmacológico de *S. minor magnolii*, con objeto de justificar sus usos populares como planta medicinal.

La validación farmacológica de estos usos a nivel experimental, así como el aislamiento del principio o principios responsables de su actividad, constituye el proyecto experimental de esta Tesis Doctoral.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.- ASPECTOS BOTÁNICOS DEL GÉNERO *Sanguisorba*

I.1.- SITUACIÓN TAXONÓMICA

La familia *Rosaceae* comprende unas 3000 especies vegetales pertenecientes a un centenar de géneros, distribuidos ampliamente por la flora mundial, en especial de Europa, Asia y América del Norte. La importancia de esta familia radica en que aporta numerosas especies empleadas como plantas medicinales, algunas de las cuales son consideradas como drogas oficiales (Farmacopea Española, 1954; Delaveau, 1982).

Entre los géneros con interés farmacológico, se encuentra el género *Sanguisorba*, cuyas especies son empleadas a nivel popular. En la revisión bibliográfica realizada, se constata que la posición botánica exacta de este género no está del todo clara, ya que algunas especies aparecen reseñadas dentro del género *Poterium*. Lázaro e Ibiza, en su "Botánica Descriptiva" (1896), establece la siguiente taxonomía para este género:

TIPO: *Fanerogamas*

SUB-TIPO: *Angiospermas*

CLASE: *Dicotiledóneas*

SUB-CLASE: *Dialipetalas superovarieas*

SERIE: *Polistemona*

ORDEN: *Rosidas*

FAMILIA: *Sanguisorbeas*

GÉNERO: *Poterium*

Font-Quer en su obra "Dioscórides Renovado" (1979), reseña el *Poterium sanguisorba* L., denominándola con el nombre vulgar de "pimpinela menor", y englobando bajo esta misma denominación a otras especies del género *Poterium*.

Con respecto a *Sanguisorba minor magnolii*, taxon objeto de estudio de esta Memoria, la descripción taxonómica más reciente viene reseñada en "Flora Europea" (1976):

DIVISIÓN: *Espermatophita*

CLASE: *Angiospermas*

SUB-CLASE: *Dicotiledóneas*

ORDEN: *Rosales*

FAMILIA: *Rosaceae*

SUB-FAMILIA: *Rosoideae*

GÉNERO: *Sanguisorba*

SUB-GÉNERO: *Poterium*

ESPECIE: *minor*

SUB-ESPECIE: *magnolii*

L2.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Las especies de la familia *Rosaceae* son hierbas, arbustos o árboles, con hojas generalmente alternas y estipuladas, y flores regulares. Los frutos suelen ser aquenios, drupas o pomos. A esta familia pertenecen la mayoría de los árboles frutales más comunes, como cerezos, ciruelos, manzanos,...

Un detalle botánico importante en estas plantas, es la presencia de una parte característica de la flor, el hipantio, sobre cuya parte externa nacen los carpelos. Atendiendo a sus características botánicas, existen cuatro sub-familias con marcadas diferencias (Cronquist, 1981):

Sub-familia *Spiroideae*: flores pentámeras. Hipantio liso, cóncavo o campanulado, sin carpóforo. Número de carpelos: 1-5. Frutos con 1-5 folículos. Géneros más representativos: *Sorbaria*, *Spirea*...

Sub-familia *Rosoideae*: flores tetra, penta ó hexámeras. Hipantio liso o cóncavo, frecuentemente con carpóforo central. Un carpelo. Fruto en aquenio o drupa. Géneros más representativos: *Filipendula*, *Rosa*, *Sanguisorba*, *Potentilla*, *Alchemilla*,...

Sub-familia *Maloideae*: flores pentámeras. Hipantio tubular. Número de carpelos: 2-5. Fruto en pomo. Géneros más representativos: *Cydonia*, *Pyrus*, *Crataegus*,...

Sub-familia *Prunoideae*: flores pentámeras. Hipantio cóncavo o tubular. Fruto en drupa con una semilla. El género más representativo es *Prunus*, con aproximadamente unas 200 especies.

La descripción botánica de la especie *Sanguisorba minor* reseñada en "Flora Europea" (1976), la considera como:

"Hierba perenne de 10-90 cm, glabra o vellosa, con una roseta de hojas basal bien desarrollada. Rizoma y tallos erectos, en cuyos extremos van las flores y hojas. Hojas con 3-12 pares de foliolos redondos o elípticos de 0.5-2 cm, longitudinales, peciolados e inciso-aserrados. Capitulo de 1 a 3 cm, de globoso a ovoide. Flores superiores femeninas, las inferiores masculinas, y centrales hermafroditas, con 2 ó 3 bracteolas. Pétalos ausentes. Numerosos estambres. Estilo terminal. Fruto: aquenio encerrado en un hipantio de 3-8 mm con 4 ángulos, alomado o alado, y con las caras reticuladas o esculpidas en varias direcciones".

Existen diferentes sub-especies de *S. minor*, diferenciables por los caracteres del hipantio, aunque a veces no se correlacionan con otros caracteres de la planta. Las sub-especies que crecen en la Península Ibérica son:

- **ssp. *minor* L.** (= *Poterium sanguisorba* L., *P. dictyocarpum* Spach.). Hipantio con los 4 ángulos marcados, alomados. No verrucoso, alargado, con caras reticuladas.
- **ssp. *lateriflora* Cosson.** Hipantio con 4 ángulos, no verrucoso, subgloboso, con las caras marcadas por hoyos, débilmente reticulados.

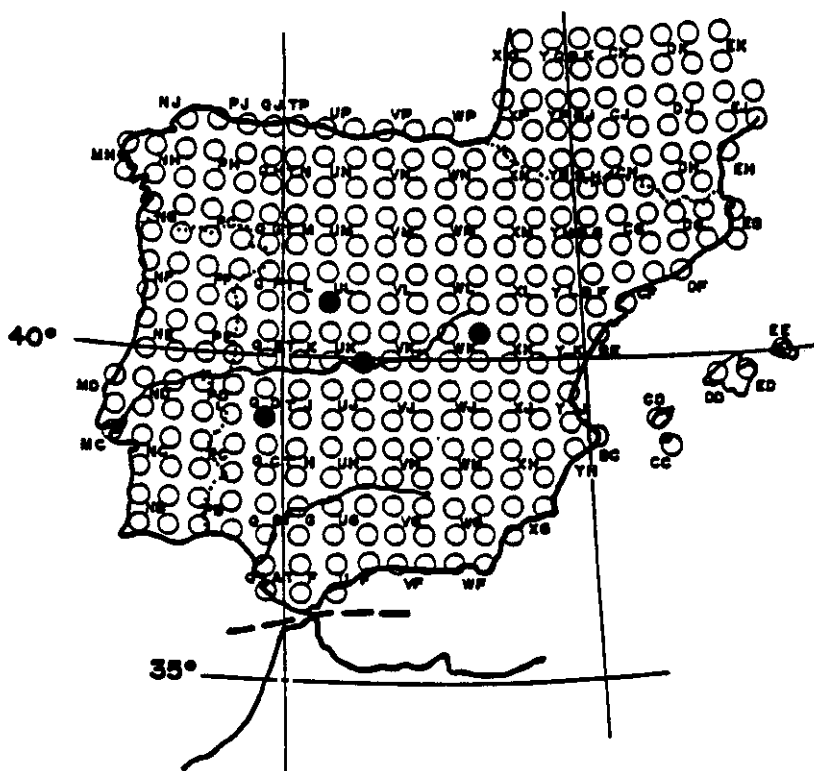
- **ssp. *magnolii* Spach.** (= *P. magnolii* Spach.). Hipantio escasamente anguloso, fuertemente verrucoso.
- **ssp. *muricata* Briq.** (= *P. polygamum* Waldst & Kit). Hipantio con 4 ángulos alados de 1 a 5 veces más largo que ancho. Caras cubiertas por arrugas irregulares.
- **ssp. *rupicola* Boisse y Reuter.** Hipantio 1 ó 2 veces más largo que ancho. Igual descripción que la sub-especie *muricata*.



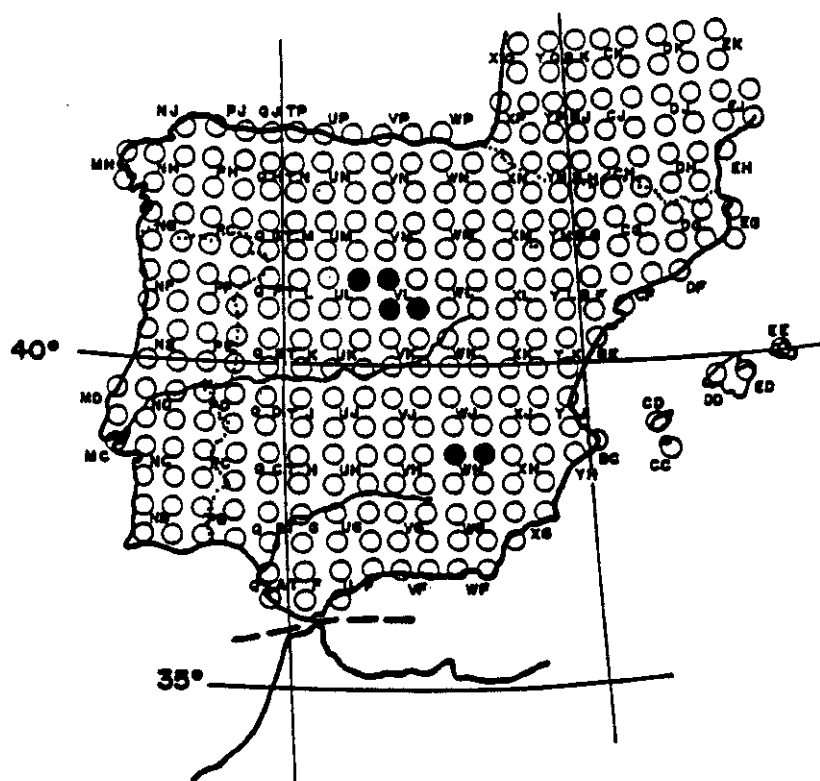
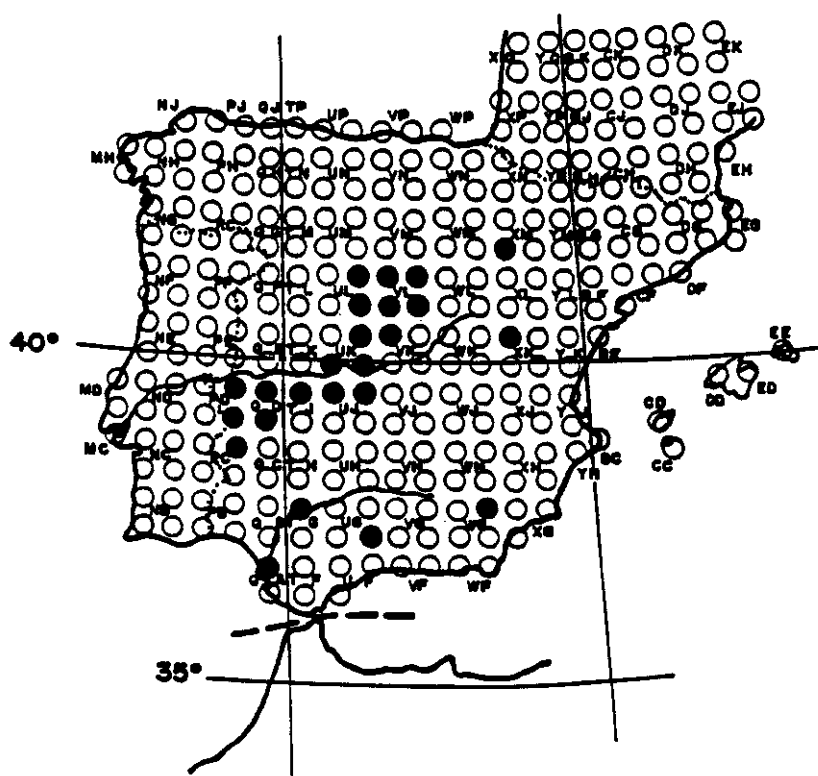
Frutos de las distintas subespecies de *S. minor*. De izquierda a derecha: *ssp. minor*; *ssp. lateriflora*; *ssp. magnolii*; *ssp. muricata*; *ssp. rupicola*.

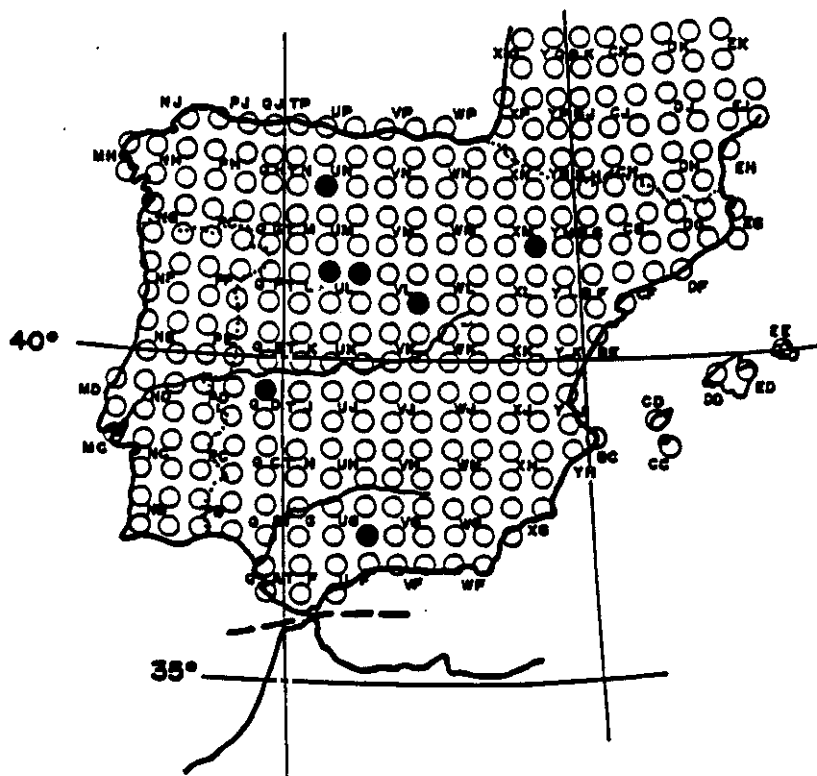
C

ut

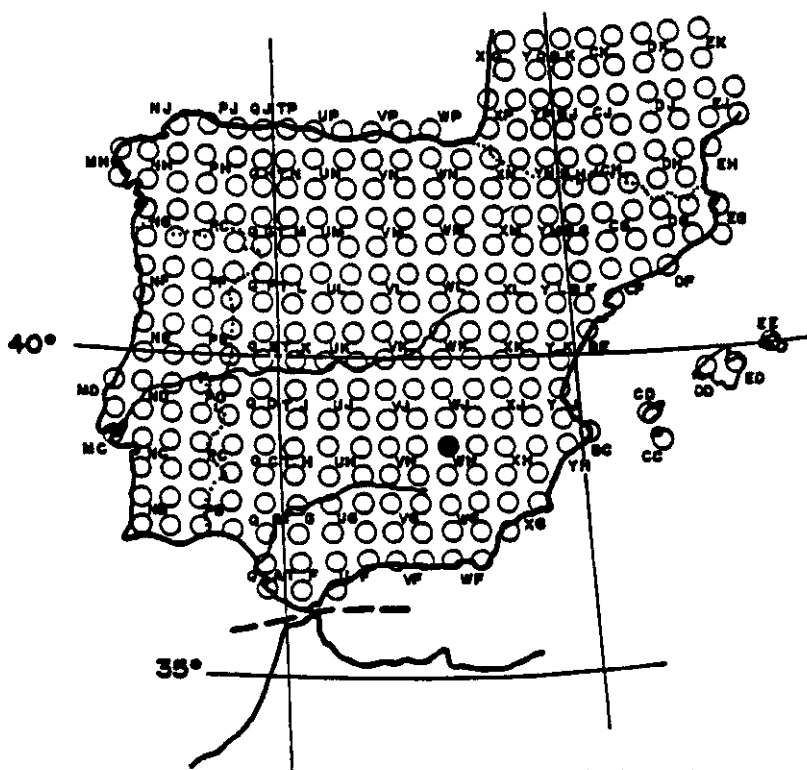


Distribución geográfica de *S.m. minor* L.

Distribución geográfica de *S.m.lateriflora* CossonDistribución geográfica de *S.m.magnolii* Spach.



Distribución geográfica de *S.m. muricata* Briq.

Distribución geográfica de *S.m.rupicola* Boisse y Reuter

II.- ASPECTOS FITOQUÍMICOS

II.1.- REVISIÓN FITOQUÍMICA DEL GÉNERO *Sanguisorba*

En la revisión bibliográfica realizada, se han encontrado pocas referencias acerca de la composición química de la especie *Sanguisorba minor magnolii*, y especies próximas a ella. En el género *Sanguisorba*, los compuestos descritos son mayoritariamente de tipo polifenólico, fundamentalmente taninos, y saponinas de esqueleto triterpénico. Por esta razón, se abordará con mayor detalle el estudio de estos principios dentro del género *Sanguisorba*, y de la familia *Rosaceae* en general. Para facilitar la exposición de esta revisión fitoquímica, se consideran por separado los aspectos de extracción, separación e identificación estructural de estos compuestos, así como sus propiedades biológicas e incidencia en la familia.

II.1.1.- COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

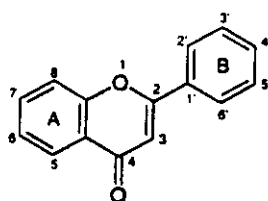
II.1.1.1.- FLAVONOIDES

Generalidades

Los flavonoides son quizás los compuestos polifenólicos más ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se han llegado a aislar hasta varios cientos de los mismos, presentes en la naturaleza. Se pueden encontrar en forma libre (geninas o agluconas), o combinados con azúcares formando heterósidos, constituyendo éstos los principales pigmentos hidrosolubles de los vegetales, responsables de la coloración de flores y frutos. Las geninas libres se encuentran presentes en mayor medida en tejidos lignificados.

Estructuralmente, los flavonoides poseen un esqueleto de 15 átomos de carbono, en los cuales 2 núcleos bencénicos (anillo A y B), están unidos por un eslabón de 3 carbonos. El término "flavonoide", tomado en su más amplio sentido, se aplica a estructuras muy diversas, pero derivadas básicamente del mismo núcleo, el 2-fenil cromano:

- 2-fenil cromonas: **flavonas**, **flavonoles**, **flavanonas**, **isoflavonas** ... y estructuras dimeras
- 2-fenil cromanos o **flavanos** : catequinas, leucoantocianos o proantocianos
- **antocianos** : estructuras intermediarias entre catecoles y flavonoides
- **chalconas**, formas isómeras abiertas de las flavanonas
- **auronas**, homólogos de las flavonas, con un anillo heterocíclico pentagonal



Estructura general de flavonoide

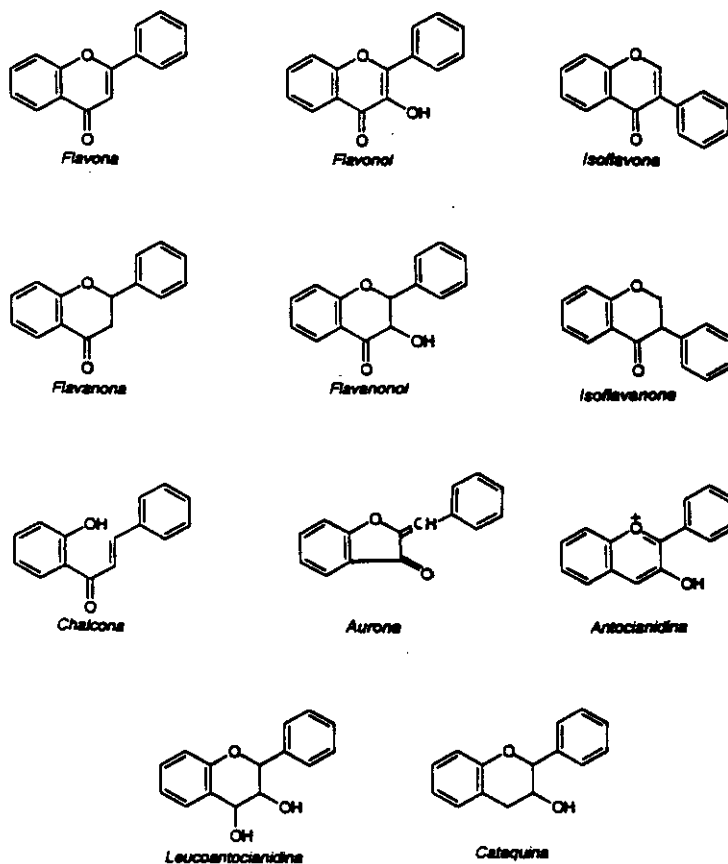


Figura 1

En la Figura 1 se muestran los esqueletos básicos de flavonoides más frecuentes, cuya variación estructural y distribución en la naturaleza ha sido objeto de estudio en numerosas revisiones bibliográficas (Wollenweber, 1988; Harborne & Williams, 1988; Chopin & Dellamonica, 1988). No obstante, los flavonoides más abundantes en el reino vegetal, y que quizás por eso han merecido mayor atención en cuanto a sus propiedades farmacológicas, son las flavonas, flavonoles y sus heterósidos, por lo que se abordará con mayor detalle el estudio de los mismos.

Hasta el momento, se han llegado a aislar hasta más de 500 compuestos diferentes de este tipo, recibiendo genéricamente nombres triviales relacionados con la especie vegetal de la que proceden. La diferencia estructural básica entre flavonas y flavonoles, es la presencia de oxigenación en el C-3 de los flavonoles, mientras que una oxigenación adicional en otras posiciones del anillo A ó B, no modifica la nomenclatura genérica del compuesto. Biogenéticamente, queda aceptado que los flavonoides proceden de la ruta metabólica combinada malonato/sikimato, por lo que es frecuente la presencia de nuevas oxigenaciones en las posiciones 5, 7, 3' y 4' de flavonas y flavonoles.

Incidencia en la familia

Los flavonoides son metabolitos muy extendidos entre las Rosaceas, siendo especialmente abundantes los derivados flavonólicos. Sin embargo, no constituyen los únicos principios activos de estas especies, sino que se encuentran acompañando a otras sustancias, como taninos y saponinas triterpénicas.

Dentro del género *Sanguisorba*, la especie más estudiada desde el punto de vista químico es *S. officinalis*, lográndose identificar, entre otros flavonoides, quercetina, rutina, y diversos heterósidos de apigenina, luteolina y kemferol (Kaneta *et al.*, 1979). Se conoce también la composición en flavonoides de algunas sub-especies de *S. minor*, en concreto en las sub-especies *muricata* y *lasiocarpa*, se han identificado mayoritariamente quercetina, y heterósidos de la misma y kemferol (Shukyrov & Nasudari, 1970).

En este apartado, cabe destacar la cada vez mayor presencia en la naturaleza de estructuras clásicas de flavonas y flavonoles, pero en una nueva forma conjugada, unidas

covalentemente a sulfatos o bisulfatos inorgánicos. Aunque la función exacta de estos flavonoides sulfatados en los vegetales no está del todo clara, parece ser que su formación representa uno de los principales mecanismos de destoxificación, tal y como ocurre en los tejidos animales. Alguno de estos compuestos han sido descritos dentro de la familia *Rosaceae*, en concreto en diversas especies del género *Potentilla* y *Sanguisorba*, entre ellas la *S. minor* (Harborne, 1977).

Aislamiento e identificación

Los flavonoides son, por lo general, compuestos de gran estabilidad, que pueden ser extraídos directamente del material vegetal desecado, por contacto con el disolvente, en frío (maceración) o en caliente (extracción a reflujo). En la elección del disolvente se tiene en cuenta la polaridad de la molécula; así, para la extracción de geninas se suelen emplear disolventes poco polares, como hexano, diclorometano..., mientras que los heterósidos se extraen mejor con mezclas hidroalcohólicas, donde la proporción de agua sea baja (1:5). Otro procedimiento a menudo utilizado, es la extracción con disolventes de polaridad creciente, consiguiendo un fraccionamiento de los principios activos en función de su polaridad (extracción Soxhlet).

Para la separación de flavonoides y heterósidos flavónicos, la cromatografía en columna de gel de sílice es la técnica más barata y conveniente a utilizar. Además del silicagel, también se emplean otros tipos de adsorbentes con resultados satisfactorios, como celulosa, poliamida, etc... Aunque la bibliografía aporta numerosos datos acerca de las fases móviles a emplear, la elección debe estar basada igualmente, en función de la polaridad de la molécula a aislar, o en función de los diferentes pesos moleculares en el caso de utilizar la cromatografía de exclusión (Sephadex).

En el análisis estructural de compuestos flavónicos, son utilizadas las técnicas espectroscópicas típicas para la elucidación de productos naturales: espectroscopía infrarroja (IR), espectroscopía de masas (EM), y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), tanto de protón (^1H -RMN), como de carbono (^{13}C -RMN). Sin embargo, en el caso de los flavonoides, la espectrofotometría UV/VIS proporciona datos muy valiosos, y que son el punto de partida en su análisis estructural. El espectro de los flavonoides en metanol, así como las

modificaciones producidas por la adición de diferentes reactivos, proporciona una importante información estructural, que puede ser complementada por las otras técnicas espectrales. En este sentido, cabe destacar las pautas propuestas por Mabry (1970) y Voirin (1983), que han llegado a constituir un método standarizado para la elucidación estructural de compuestos flavónicos.

En nuestro país, el grupo de investigación encabezado por el Dr. Villar, posee amplia experiencia en el aislamiento e identificación de flavonoides a partir de especies vegetales, de lo que queda constancia en la bibliografía especializada (Villar *et al.*, 1985; Abad *et al.*, 1993; Slowing *et al.*, 1994; Palomino *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1997).

Propiedades biológicas

Las propiedades biológicas de los flavonoides son conocidas desde antiguo. Fué en 1936, cuando se demostró la eficacia de los frutos del limón (*Citrus limon*) en el tratamiento de los casos de escorbuto. Años más tarde, este efecto fué atribuido a su doble contenido en vitamina C y flavonoides, dada la propiedad de estas moléculas flavónicas de prevenir la fragilidad capilar.

El amplio espectro de actividades biológicas dentro de este grupo de compuestos, así como la multiplicidad de acciones que presentan alguno de sus miembros, hacen de los flavonoides uno de los grupos más amplios e interesantes de productos biológicamente activos, denominados genéricamente "bioflavonoides". La presencia de estas moléculas en la naturaleza, así como su relación estructura-actividad, ha sido objeto de estudio en numerosas revisiones bibliográficas de los últimos años (Anton, 1988; Miquel *et al.*, 1989; Pathak *et al.*, 1991).

Además de sus propiedades como factor vitamínico P, otras muchas acciones farmacológicas han sido atribuidas a los flavonoides. Poseen actividad antiinflamatoria, no solo actuando a nivel de permeabilidad capilar, sino también en otros estadios de la inflamación. Estas moléculas se han mostrado como potentes inhibidores de alguna de las rutas de la cascada del ácido araquidónico, siendo también importantes captadores de radicales libres (Monboisse *et al.*, 1983; Alcaraz & Hoult, 1985; Villar *et al.*, 1987; Cotellet *et al.*, 1996). Presentan también actividad antiulcerosa, estrechamente relacionada con sus efectos analgésicos e inmunomoduladores (Alcaraz & Hoult, 1985; Alarcón de la Lastra *et al.*, 1994).

Alguna de estas moléculas poseen efectos espasmolíticos y vasodilatadores coronarios, muy probablemente a través de un mecanismo calcio-dependiente (Laekeman *et al.*, 1986; Abdalla & Abu Zarga, 1987; Ubeda & Villar, 1989; Choi *et al.*, 1991). Hay que resaltar además, la actividad citotóxica, antimicrobiana y antiviral de los flavonoides, que hace de estos compuestos una de las principales y más valiosas fuentes actuales de búsqueda en la quimioterapia antiviral (Van Hoof *et al.*, 1984; Wong *et al.*, 1987; Mori *et al.*, 1987; Fukui *et al.*, 1988; Hayashi *et al.*, 1988; De Rodriguez *et al.*, 1990; González *et al.*, 1990).

IL1.1.2.- TANINOS

Generalidades

Los taninos son sustancias de naturaleza polifenólica, de alto peso molecular, que a menudo se presentan combinadas con otras sustancias, como carbohidratos, proteínas, etc... Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, llegando a representar un elevado porcentaje respecto a su composición química total. En otro contexto, cabe destacar que constituyen quizás, el primer grupo de productos naturales a los que se les encontró aplicación a nivel industrial.

Los taninos mayoritarios presentes en la naturaleza, se incluyen dentro de los dos principales grupos de estos metabolitos: taninos hidrolizables y condensados (catéquicos).

Los taninos hidrolizables o gálicos son los estudiados más ampliamente durante la última década, estudios que quedan recopilados en diversas revisiones bibliográficas (Haslam, 1982; Dey & Harborne, 1989). Se trata de metabolitos de polioles, acoplados a una o más unidades de ácidos fenólicos, generalmente ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos). Estas moléculas pueden sufrir una unión oxidativa (C-C o C-O) con otra unidad fenólica, dando lugar a una amplia y estructuralmente compleja variedad de metabolitos secundarios. La ruta biosintética más común de estos taninos viene reflejada en la Figura 2 (tomada de Dey & Harborne, 1989), donde se muestran los metabolitos más frecuentes, con glucosa como poliol.

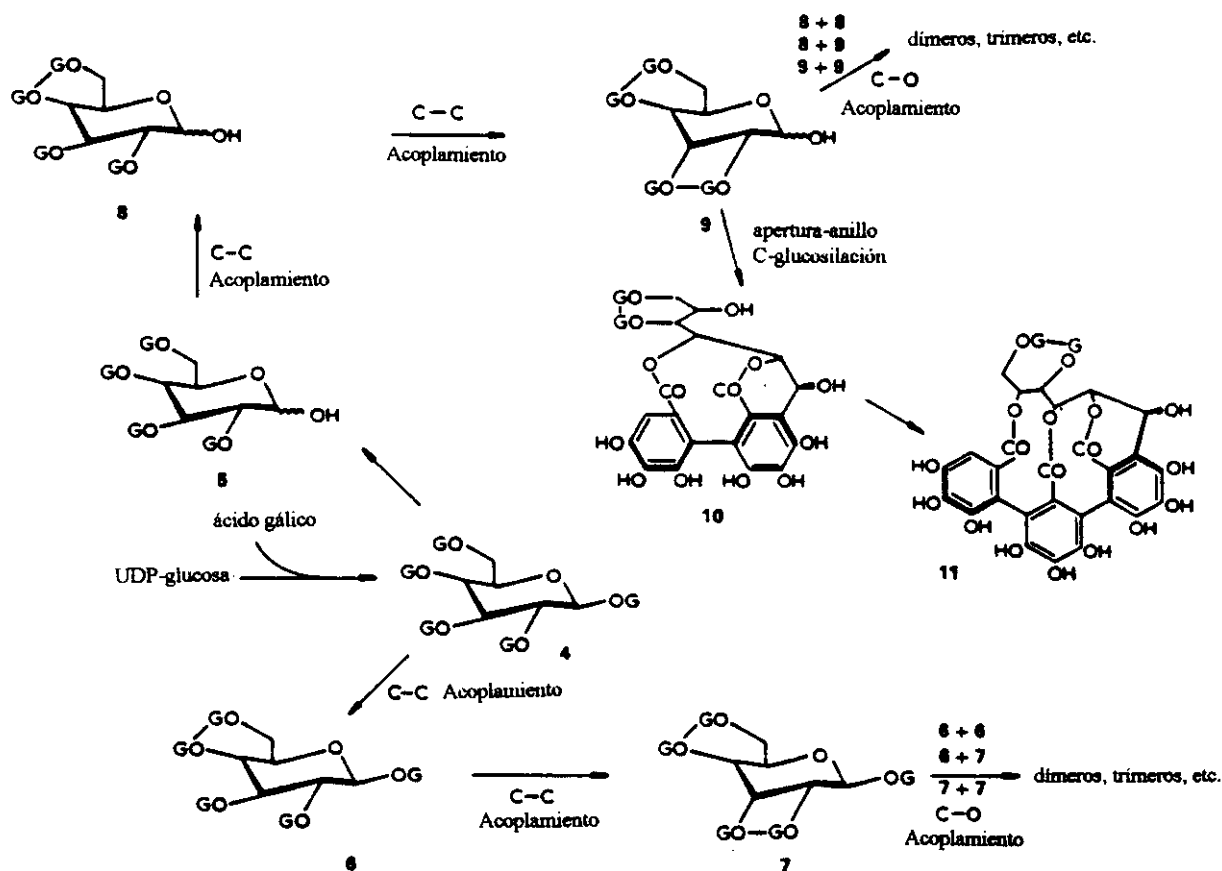


FIGURA 2 : Biogénesis y relaciones estructurales de galotaninos y elagitatinos.

4 : pentagalloyl-D-glucose; 5 : tetragalloyl-D-glucose; 6 : eugenin; 7 : casuarictin;

8 : tellemagrandin; 9 : pedunculagin; 10 : casuariin; 11 : castalagin.

Los taninos condensados o proantocianidinas están estructuralmente constituidos por cadenas de flavan-3-ol. Biogenéticamente, derivan de la ruta de flavonoides, por α o β -hidroxilación en posición 3. El primer precursor biosintético de esta ruta es la (2R,3S) o (2R,3R)-dihidroquercetina, de la que derivan estructuras que, desde el punto de vista estereoquímico, presentan elevada complejidad (Figura 3, tomada de Dey & Harborne, 1989).

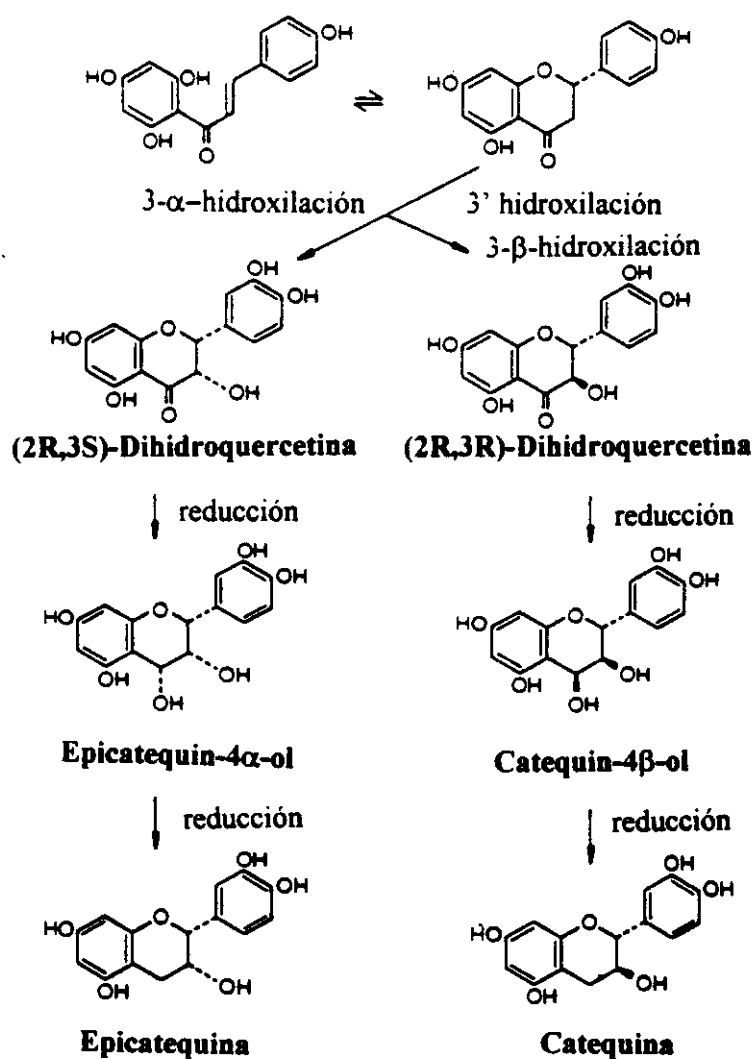


FIGURA 3: Biosíntesis de los precursores de procianidinas.

Incidencia en la familia

Los taninos son principios activos muy repartidos en todo el reino vegetal, pero especialmente abundantes en algunas familias, entre ellas la *Rosaceae*, donde se llegan a alcanzar porcentajes del 20% en algunas especies. Este es el caso del rizoma de *Potentilla tormentilla*, *P. anserina* y *P. erecta*, así como diversas especies del género *Alchemilla* (Geiger *et al.*, 1994; Schimmer & Lindenbaum, 1995).

Dentro del género *Sanguisorba*, los taninos se encuentran descritos mayoritariamente en la especie *S. officinalis*, especie ampliamente investigada por el grupo de Tanaka, Nonaka *et al.* (1983; 1984; 1985). Fruto de estas investigaciones, es el aislamiento de ésteres del ácido gálico estructuralmente complejos, y diversas moléculas de elagitaninos. Esta especie, *S. officinalis*, ha sido también estudiada en cuanto a la variabilidad en su contenido en taninos según el periodo estacional y zona de recolección, comprobándose que la proporción es mayoritaria durante la primavera, incrementándose en zonas de mayor altitud (Mel'Chakova & Kharitonova, 1975; Krylova & Orishchenko, 1978). Más recientemente se ha venido investigando la producción de taninos en cultivos celulares de esta especie (Ishimaru *et al.*, 1990).

Algunos de los taninos hidrolizables y proantocianidinas aisladas en *S. officinalis*, han sido identificados también, en cantidades incluso cuantitativamente superiores, en diversas sub-especies de *S. minor* (Diak & Kohlmunzer, 1983; Lamaison *et al.*, 1990; Reher *et al.*, 1991c).

Aislamiento e identificación

Este tipo de compuestos, con anillos aromáticos altamente oxidados, son preferentemente extraídos por maceración directa del material vegetal con mezclas hidroalcohólicas. Las combinaciones más frecuentes incluyen mezclas de etanol-agua, metanol-agua, etanol-agua-acetona y acetona-agua. Aunque es muy difícil generalizar sobre la conveniencia de estas combinaciones, hay que tener en cuenta que las mezclas de mayor polaridad son útiles para separar compuestos de bajo peso molecular, mientras que las mezclas etanólicas separan mayoritariamente moléculas diméricas de proantocianidinas.

El extracto resultante puede ser fraccionado directamente por cromatografía en columna de exclusión, utilizando Sephadex LH-20 como adsorbente, y mezclas hidroalcohólicas de polaridad decreciente como eluyente (Nonaka *et al.*, 1984). Otras técnicas cromatográficas alternativas han sido también utilizadas con éxito en la separación de taninos, como es la cromatografía en contracorriente por goteo (DCCC, del inglés "droppet counter current chromatography"), y la cromatografía centrífuga de partición, donde se emplean solventes de mayor polaridad (Okuda *et al.*, 1989a).

En la identificación de taninos, las técnicas espectroscópicas de UV/VIS e IR nos proporcionan una información restringida y limitada acerca de la estructura de la molécula. No es así con la espectroscopía de masas, técnica tradicionalmente empleada para la elucidación estructural de estos compuestos (Hethelyi *et al.*, 1987). Más recientemente, el uso de esta técnica se ha extendido considerablemente, al introducir modificaciones en la misma, que contribuyen en buena medida a la elucidación estructural y conformacional de taninos. Se trata de la FAB (del inglés "fast atom bombardement"), que facilita el examen de compuestos termolábiles y de baja volatilidad, mediante un bombardeo con átomos neutros rápidos (Rasetti *et al.*, 1995).

En combinación con estas técnicas, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, tanto la ^1H -RMN como la ^{13}C -RMN, constituyen el arma principal para dilucidar las complejas estructuras de los taninos. La ^1H -RMN proporciona información directa acerca de la estereoquímica de la molécula, particularmente la conformación del poliol en los taninos hidrolizables, y del anillo C en las unidades flavan-3-ol de las proantocianidinas. La principal desventaja de esta técnica es la dificultad de interpretación del espectro en el caso de moléculas grandes (dímeros o trímeros), debido a la superposición de señales y efectos de amplificación. En contraste, la ^{13}C -RMN proporciona información definitiva acerca de la estructura de estas moléculas, incluso de polímeros y oligómeros con un grado de polimerización de 20 unidades.

Propiedades biológicas

Históricamente, la importancia de los taninos ha estado ligada a sus propiedades curtientes, es decir, a la propiedad de transformar la piel fresca en cuero, por su capacidad de combinarse con proteínas. Tienen sabor astringente, y propiedades hemostáticas y cicatrizantes. Por vía interna, ejercen un efecto antidiarreico y antiséptico, mientras que tópicamente impermeabilizan las capas más externas de la piel y mucosas. También presentan propiedades vasoconstrictoras sobre vasos sanguíneos superficiales.

A este amplio rango de actividades farmacológicas, hay que sumar otros efectos de taninos aislados de especies vegetales (Okuda *et al.*, 1989b). Presentan marcadas propiedades antimicrobianas (Hussein & Yankov, 1985), citotóxicas (Yoshida *et al.*, 1991) y antivirales (Kakinchi *et al.*, 1985 ; Takechi *et al.*, 1985; Nonaka *et al.*, 1990; Mizuno *et al.*, 1992;

.Lutete *et al.*, 1994) por su capacidad de precipitar proteínas, así como efectos antiinflamatorios (Kimura *et al.*, 1986). Se han mostrado como potentes inhibidores de la peroxidación lipídica (Kimura *et al.*, 1984; Uchida *et al.*, 1988), así como agentes protectores de la mucosa gastrointestinal (Ezaki *et al.*, 1985; Verhaeren & Lemli, 1986; Horigome *et al.*, 1988; Murakami *et al.*, 1991). Presentan también actividad sobre músculo cardíaco y presión sanguínea (Calixto *et al.*, 1986). El ácido tánico a su vez, ha mostrado una acción inespecífica depresora del sistema nervioso central (Takahashi *et al.*, 1986).

Los elagitaninos aislados de *S. officinalis* muestran potente actividad antihemorrágica (Kosuge *et al.*, 1984), citotóxica (Bastow *et al.*, 1993) e hipoglucemiante (Sheehan *et al.*, 1983), siendo éste último efecto, sinérgico con el de las saponinas triterpénicas presentes en la especie (Reher *et al.*, 1991c). Con respecto a la *S. minor*, únicamente se han encontrado referencias en la bibliografía, acerca de la actividad enzimática inhibidora de la elastasa, actividad que se le atribuye a su contenido en taninos (Lamaison *et al.*, 1990).

II.1.1.3.- ÁCIDOS FENÓLICOS

Se trata de compuestos aromáticos estructuralmente sencillos, que se encuentran presentes prácticamente en todos los vegetales. Pueden aparecer en forma libre, en forma de ésteres, o como compuestos heterosídicos más complejos. Desde el punto de vista químico, se clasifican en:

- derivados del ácido benzoico: ácido gálico, ácido salicílico...Algunas de estas moléculas son constituyentes de la lignina, formando parte también de la estructura de los taninos.
- derivados del ácido cinámico: ácido cafeico, ácido rosmarínico... Son estructuras de 9 átomos de carbono, caracterizados por primera vez en el romero y en las semillas de café.

Las implicaciones farmacológicas de este tipo de compuestos han sido ampliamente investigadas. Poseen marcada actividad analgésica y antiinflamatoria, así como propiedades antioxidantes (Toda *et al.*, 1991). En este sentido, ha sido recientemente descrito el posible mecanismo de acción antirradicalario del ácido gálico (Haslam, 1996). Asimismo, los ácidos fenólicos presentan propiedades antibacterianas (Corthout *et al.*, 1994), y antivirales (Hirabayashi *et al.*, 1995).

La incidencia de los ácidos fenólicos en el género *Sanguisorba*, y familia *Rosaceae* en general, no aparece apenas reseñada en la literatura especializada. Unicamente se han encontrado referencias bibliográficas acerca de la presencia de ésteres del ácido gálico y otros ácidos fenólicos en la especie *S. officinalis* (Nonaka *et al.*, 1982).

En un screening fitoquímico preliminar realizado con esta especie, *S. minor magnolii*, se detectó la presencia de ácido cafeico, ácido gálico y ácido p-cumárico (Rodríguez, 1984).

II.1.2.- SAPONINAS

Generalidades

Las saponinas son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y que constituyen uno de los tipos más frecuentes de metabolitos secundarios existentes en la naturaleza. Alrededor del 76% de las familias investigadas contienen en mayor o menor medida saponinas, estando éstas presentes en al menos 500 géneros vegetales (Guvanov *et al.*, 1970). El nombre "saponina" proviene de la palabra latina "sapo" ("jabón"), que hace alusión al uso que desde antiguo se ha hecho de plantas ricas en estos compuestos, por su acción detergente. Esta propiedad tensoactiva de las saponinas hace que hayan tenido y sigan teniendo en la actualidad, múltiples aplicaciones comerciales e industriales (Birk, 1969; Nakayama *et al.*, 1986).

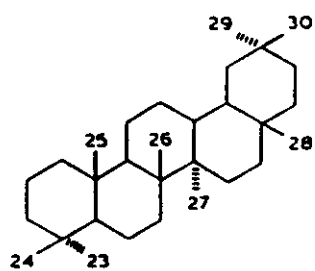
Químicamente, las saponinas son fundamentalmente heterósidos que por hidrólisis liberan uno ó más azúcares, y una genina o aglucón con un sistema de anillos policíclicos derivados del escualeno, y que recibe el nombre de sapogenina. El residuo azucarado puede estar unido por medio de un solo grupo hidroxilo de la genina (saponinas "monodesmosídicas"), o más raramente, a través de dos grupos hidroxilo, o un solo grupo hidroxilo y un grupo carboxilo (saponinas "bi-desmosídicas") (Wagner *et al.*, 1984). En función de la estructura química de la sapogenina, las saponinas se dividen clásicamente en dos grupos principales: esteroídicas y triterpénicas. Salvo algunas excepciones, las sapogeninas esteroídicas son características de las Monocotiledóneas, mientras que las sapogeninas triterpénicas se

encuentran distribuidas ampliamente en las Dicotiledóneas, y constituyen la mayor parte de las saponinas encontradas en la naturaleza.

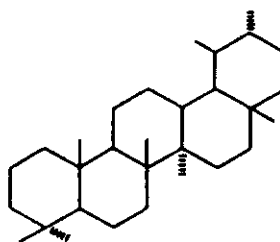
En la revisión bibliográfica realizada, las saponinas descritas para las especies más próximas a *S. minor magnolii* son triterpénicas, por lo que se profundizará más en el estudio de las mismas.

La existencia de saponinas triterpénicas es conocida desde antiguo. Las investigaciones encaminadas al aislamiento e identificación de estos compuestos, así como el estudio de sus propiedades químicas y biológicas, quedan reflejadas en diversas revisiones bibliográficas realizadas en las últimas décadas (Basu & Rastogi, 1967; Hiller *et al.*, 1977, 1982; Bader & Hiller, 1987; Connolly & Hill, 1989; Schöpke & Hiller, 1990).

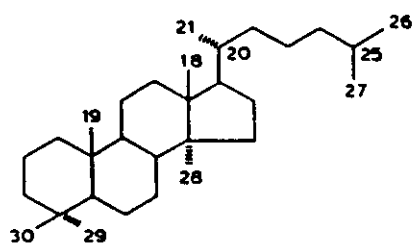
Desde el punto de vista químico, las saponinas triterpénicas tienen en común, con algunas pocas excepciones, la presencia de una genina de 30 átomos de carbono, generalmente perteneciente al grupo de la β -amirina. La mayoría de las saponinas triterpénicas conocidas (más del 50%) derivan del núcleo del oleanano, aunque también se han descrito de tipo dammarano, ursano y otros (Hostettman & Lea, 1987). En la Figura 4 (tomada de Hostettman & Lea, 1987), vienen reflejados diversos tipos de sapogeninas descritas en la bibliografía. Pueden presentar funciones alcohol o ácido, aunque en ocasiones se han detectado también funciones lactónicas y aldehído. Una amplia variedad de saponinas difieren sólo en el número y tipo de uniones del azúcar con la sapogenina. La unidad azucarada usualmente aparece en forma piranosa, y en ocasiones puede estar parcialmente acetilada. Suele contener de 1 a 6 unidades monosacáridicas, siendo las más comunes glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, fucosa, xilosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico.



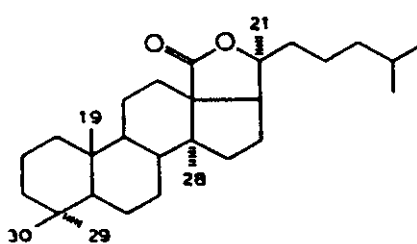
Oleanano



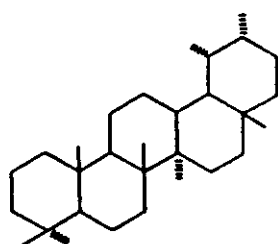
Ursano



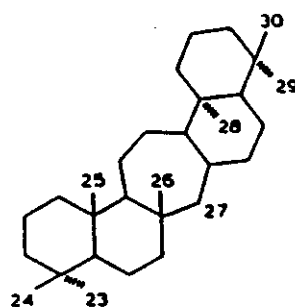
Lanostano



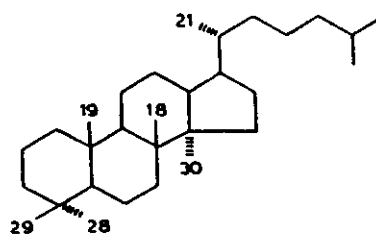
Holostano



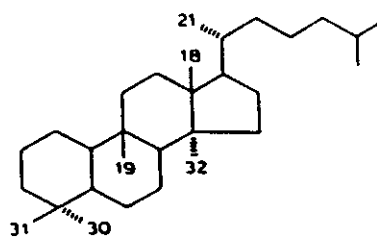
Taraxastano



Serratano



Dammarano



Cucurbitano

FIGURA 4: Principales estructuras de sapogeninas triterpénicas

Incidencia en la familia

Dentro de la familia *Rosaceae*, predominan las saponinas triterpénicas de tipo pentacíclico, tales como el ácido oleánico y derivados, ácido ursólico, ácido torméntico, etc... (Hegnauer, 1973).

El ácido torméntico y el ácido ursólico, identificados por primera vez en otra especie de la familia, *Potentilla tormentilla* (Potier *et al.*, 1966; Bilia *et al.*, 1994), han sido descritos también dentro del género *Sanguisorba*. Así, el ácido torméntico es identificado en *Poterium spinosum* (Pourrat *et al.*, 1973) y *P. ancistroides* (Villar *et al.*, 1986), mientras que el ácido ursólico y derivados son descritos en *S. alpina* (Jia *et al.*, 1993).

También en la década de los 90, Reher *et al.* (1991a, b) al realizar un estudio quimiotaxonómico entre diferentes especies del género, entre ellas la *S. minor*, logran identificar diversos derivados del ácido torméntico, que ya habían sido descritos previamente dentro de la familia *Rosaceae* (Seto *et al.*, 1984; Shigenaga *et al.*, 1985; Gao *et al.*, 1985; Stachnrski *et al.*, 1995).

Desde el punto de vista quimiosistemático, es interesante destacar que el patrón triterpénico de *S. minor* se asemeja al de especies como *Sarcopoterium spinosum* (= *Poterium spinosum*), no siendo tanto así con especies que, bajo un criterio botánico, están más estrechamente relacionadas con ella, como es el caso de *S. officinalis*. Nuevas investigaciones quimiosistemáticas serán de ayuda vital para esclarecer la taxonomía de ambos géneros, y establecer la posición botánica exacta de sus especies.

Aislamiento e identificación

Las complejas mezclas de saponinas presentes en las plantas, ofrecen a menudo problemas en los procesos de aislamiento e identificación de las mismas. Por otro lado, existe el inconveniente de la formación de "artefactos", que puede acaecer en el momento del aislamiento, durante la hidrólisis ácida que se lleva a cabo para dilucidar la estructura de la genina, e incluso en el propio material vegetal intacto, debido especialmente a ataques

fúngicos. Sin embargo, los procesos de hidrólisis ácidas son considerados como los desencadenantes más comunes de formación de "artefactos", debido por ejemplo, a fenómenos de lactonización (Romussi *et al.*, 1983).

En cuanto al aislamiento de saponinas, se suele emplear en la mayoría de los casos, una combinación de métodos de extracción del material vegetal (generalmente con metanol o etanol), partición, precipitación, y técnicas cromatográficas. Sucesivas separaciones se realizan con los métodos habituales como la cromatografía en columna, o bien por técnicas más modernas y eficaces, como la separación en contracorriente por goteo (DCCC), cromatografía líquida de media presión (MPLC), y especialmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Sin duda alguna, el desarrollo de técnicas de aislamiento y separación cada vez más resolutivas, ha contribuido a aumentar el conocimiento sobre la química de saponinas triterpénicas, y de productos naturales en general. En muchos casos, las técnicas cromatográficas habituales que utilizan gel de sílice, han sido reemplazadas por técnicas que utilizan columnas de polímeros altamente porosos, como amberlitas (Yoshikawa *et al.*, 1986, 1987), geles de poliestireno (Iwamoto *et al.*, 1987), Diaion DA-120 (Kasai *et al.*, 1988),...

En cuanto a la elucidación estructural de saponinas, se han venido utilizando las técnicas espectroscópicas habituales, encaminadas, no sólo a la determinación de estructuras moleculares, sino también a resolver problemas estereoquímicos y conformacionales. Así, cabe citar, además de la determinación de datos físicos, la espectroscopía UV/VIS, IR, EM, y en especial la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, tanto de protón ^1H -RMN, como de carbono ^{13}C -RMN (Patitucci *et al.*, 1995).

En la última década, se ha producido un espectacular avance en el desarrollo de nuevas técnicas de RMN más sensibles y resolutivas, y que han ayudado en buena manera a la elucidación estructural y conformacional de saponinas triterpénicas. Se trata de técnicas de RMN bidimensionales, que complementan las asignaciones establecidas por las ^1H -RMN y ^{13}C -RMN clásicas. En este sentido, cabe destacar la espectroscopía de correlación ^1H - ^1H y de correlación ^{13}C - ^1H , que han contribuido a establecer la estructura molecular de diferentes saponinas aisladas de especies vegetales (Begley *et al.*, 1986; Fujioka *et al.*, 1987; Cordell, 1991).

En contraste con el rápido desarrollo de estas técnicas de RMN, existen pocas referencias acerca del avance de otros métodos físicos, como es la EM, de gran ayuda en la elucidación estructural de saponinas triterpénicas.

Propiedades biológicas

La función de las saponinas en los vegetales ha sido siempre una cuestión muy discutida, no llegándose en muchas ocasiones a una explicación satisfactoria y válida para el elevado contenido presente en algunas especies (más del 30%).

Una de las hipótesis más aceptadas, es que las saponinas ejercen una función protectora de la planta frente a ataques fúngicos, hipótesis que se ve reforzada por el hecho de que se produce un aumento en el contenido en las mismas tras un ataque microbiano. De hecho, numerosas saponinas aisladas de plantas, presentan un amplio espectro de actividad antibiótica frente a bacterias y hongos (Levy *et al.*, 1986; Majester-Savornin *et al.*, 1991; Favel *et al.*, 1994), así como efectos antivirales (De Clerq, 1987; Amoros *et al.*, 1988; De Tommasi *et al.*, 1991; Hasegawa *et al.*, 1994). En el mecanismo de acción, parece estar implicado la formación de complejos con esteroides de la membrana plasmática, lo que altera la permeabilidad celular, finalizando con la muerte de la célula (Quetin-Leclercq *et al.*, 1992).

Pero además de sus propiedades antifúngicas y hemolíticas, una extensa gama de actividades biológicas han sido descritas en la bibliografía para las saponinas, y plantas ricas en estos compuestos. Así, presentan marcada actividad antiinflamatoria y antiulcerosa (Wrzeciono *et al.*, 1985; James & Pearce, 1988; Chemli *et al.*, 1990; Simon *et al.*, 1992; Recio *et al.*, 1995). Las propiedades sedantes de muchas plantas medicinales han sido atribuidas a su contenido en saponinas (Wagner *et al.*, 1983; Lei *et al.*, 1984), así como efectos cardiovasculares, espasmolíticos (Banerji *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1986), espermicidas (Pakrashi *et al.*, 1991), y hepatoprotectores (Tamai *et al.*, 1989; Shukla *et al.*, 1992; Yen *et al.*, 1994).

Otro efecto a destacar de las saponinas son sus propiedades hipoglucemiantes, propiedades que han sido descritas dentro del género *Sanguisorba*, y que son atribuidas fundamentalmente a la presencia del ácido torméntico (Villar *et al.*, 1986; Ivorra *et al.*, 1988, 1989; Reher *et al.*, 1991c).

II.1.3.- OTROS COMPUESTOS

Dentro de este apartado, se hace referencia a una serie de compuestos presentes igualmente en la naturaleza, y que se ha creído conveniente investigar su presencia dentro de *S. minor magnolii*.

Los **azúcares y mucílagos** son constituyentes normales del reino vegetal, pudiéndose presentar en forma libre o combinados, generando los diferentes heterósidos. Los glúcidos juegan un papel importante dentro del vegetal. Sirven como almacén de energía (almidón), así como transporte de la misma (sacarosa, heterósidos,...). Asimismo, pueden formar parte del esqueleto celular, y actuar como un mecanismo de destoxificación de la planta.

Sin embargo, otras actividades biológicas han sido descritas también para los mucílagos y polisacáridos (Franz, 1989). Presentan actividad protectora de la mucosa gástrica (Esquivel-Herrera *et al.*, 1987; Sakurai *et al.*, 1996), y efectos hipoglucemiantes (Tomoda *et al.*, 1987). También se han reseñado efectos antitumorales e inmunomoduladores en polisacáridos aislados de plantas (Sakagami *et al.*, 1987; Tubaro *et al.*, 1987; Oakovlev *et al.*, 1988; Tsukagoshi, 1988; Ren *et al.*, 1995). Dentro del género *Sanguisorba*, se ha demostrado la actividad anticoagulante de glúcidos aislados de *S. officinalis* (Kim *et al.*, 1993).

Los **aminoácidos** son metabolitos indispensables como elementos constitutivos de las proteínas estructurales y enzimáticas, si bien pueden originar una gran variedad de metabolitos secundarios: aminas, alcaloides, glucosinolatos,... Aunque se conocen cerca de 300 aminoácidos naturales en los vegetales superiores, sólo una veintena son constituyentes normales de las proteínas. La gran mayoría de estos compuestos pueden considerarse formando parte de los metabolitos secundarios.

Su función en los vegetales se conoce peor que la de otros muchos compuestos, aunque su incidencia y universalidad en la naturaleza indican que su formación no es debida únicamente a errores metabólicos. Si las condiciones edáficas lo permiten, algunos vegetales pueden acumular aminoácidos, localizados mayoritariamente en las semillas, lo que puede ser considerado como una forma de almacenamiento de nitrógeno.

Parece ser que contribuyen al mantenimiento y supervivencia del vegetal, ya que

presentan marcadas propiedades antifúngicas y antihelmínticas (Jiménez & Crews, 1990; Smith *et al.*, 1995). Algunos de estos aminoácidos y derivados resultan ser igualmente tóxicos para el hombre, como es el caso de las semillas de almortas, que provocan la afección conocida como latirismo.

Sin embargo, otras propiedades biológicas se han descrito para aminoácidos no constituyentes de proteínas. Así, compuestos de este tipo identificados en la cebolla (*Allium sativum*), se han mostrado como potentes inhibidores de la agregación plaquetaria *in vitro* (Mütsch-Eckner *et al.*, 1993). Parecen estar involucrados en la ruta metabólica del ácido araquidónico, concretamente interfiriendo en la formación del leucotrieno B₄ (Parnas *et al.*, 1996). Las propiedades sedantes de la Valeriana son atribuidas en parte a su contenido en aminoácidos (Santos *et al.*, 1994).

Para completar esta revisión bibliográfica cabe hablar del **aceite esencial**, sobre el que no se ha encontrado ninguna referencia dentro del género *Sanguisorba*, ó especies próximas a él.

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos terpénicos volátiles, de especial significación quimiotaxonómica dentro del reino vegetal. Según la Comisión de la "International Standard Organization", los aceites esenciales son "productos obtenidos a partir de materias primas naturales por arrastre en corriente de vapor, por proceso mecánico, por destilación seca, ó con separación de la fase acuosa por proceso físico".

Esta definición marca con claridad la diferencia existente, según su proceso de obtención, entre los aceites esenciales y otros productos olorosos de la planta, cuya composición química y propiedades farmacológicas son completamente distintas.

Con respecto a la función biológica de los terpenos, tradicionalmente se ha asignado a estos compuestos el papel de protección a las plantas frente a la depredación de animales, insectos y otros parásitos. De hecho, son numerosos los compuestos identificados en esencias, con marcadas propiedades insecticidas y antimicrobianas (Zito & Tio, 1990; Hammerschmidt *et al.*, 1993; Tirillini *et al.*, 1996).

Otras propiedades biológicas han sido descritas para aceites esenciales de plantas, entre las que cabe destacar su actividad antiinflamatoria, colerética y antiespasmódica (Paris *et al.*, 1965; Trabace *et al.*, 1992; Theron *et al.*, 1994; Peana *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 1997a, b).

II.2.- AISLAMIENTO DE PRINCIPIOS ACTIVOS

II.2.1.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

El origen de la cromatografía se remonta a principios de siglo, cuando el químico ruso Mikael Tswett observó que al pasar un extracto de plantas a través de una columna rellena de carbonato cálcico, se separaban bandas coloreadas.

Fué 30 años más tarde, cuando realmente se descubrió la importancia de estas técnicas, al investigar en el campo de los carotenoides. Desde entonces, se ha producido un desarrollo espectacular de la cromatografía, constituyendo hoy en día, la técnica más utilizada en el fraccionamiento de productos naturales.

El concepto de cromatografía se relaciona básicamente con la distribución de un compuesto entre dos fases, una de las cuales (fase móvil ó eluyente) se mueve con respecto a la otra (fase estacionaria ó adsorbente). Los métodos cromatográficos son métodos fisico-químicos de separación de especies químicas, en los que éstas se distribuyen en forma molecular entre estas dos fases no miscibles. Los diferentes tipos de cromatografía (líquida, gaseosa,...) dependen de la naturaleza respectiva de ambas fases.

En este caso, tanto para los ensayos fitoquímicos generales, como para el aislamiento de compuestos puros, se han utilizado técnicas de cromatografía gas-líquido (estudio del aceite esencial), y técnicas de cromatografía líquida; esta última puede diferenciarse a su vez, según el soporte donde se encuentra la fase estacionaria. Así, distinguimos la cromatografía en capa fina, donde el soporte es una superficie plana, y la cromatografía en columna, donde la fase estacionaria está contenida en una columna.

Por otra parte, la cromatografía líquida se puede dividir, atendiendo a la naturaleza del fenómeno de distribución, en:

- gel-filtración o cromatografía de exclusión molecular
- adsorción (cromatografía en fase normal o líquido-sólido)
- partición (cromatografía líquido-líquido)
- intercambio iónico
- fase reversa

De entre ellas, la cromatografía de adsorción es con mucho la más utilizada en el aislamiento de productos naturales, ya que engloba a distintas formas de cromatografía en columna y a la cromatografía en capa fina. Es la forma más antigua de cromatografía en la cual se utiliza una fase estacionaria sólida, y una fase móvil líquida o gaseosa.

Esta técnica implica interacciones entre el adsorbente (generalmente sílice, y en menor proporción alúmina) y las moléculas de soluto disueltas en un disolvente. El proceso puede considerarse como una competición entre las moléculas de soluto y de eluyente, por adsorber lugares sobre la superficie sólida. La separación se efectúa en base a que las moléculas son adsorbidas y separadas de forma diferente, según su estructura química. En el caso de utilizar resinas de intercambio iónico, cabe la posibilidad de separar moléculas en función de su carga eléctrica.

Los solutos son eluidos en orden creciente de polaridad, disminuyendo la retención cuando se aumenta la polaridad del eluyente. Los valores del parámetro "fuerza elutrópica" son útiles para ajustar la composición de la fase móvil, en orden a obtener la "fuerza del disolvente" correcta para una separación particular. Por esta técnica pueden ser separados compuestos de polaridad intermedia o moderada, siempre que haya un rango limitado de polaridad dentro de la mezcla a separar.

En estas técnicas de cromatografía líquida, lo que se requiere es que la muestra sea perfectamente soluble en la fase móvil líquida, aunque la elección de esta fase depende de varios parámetros. En las cromatografías de adsorción y partición, el papel más importante lo desempeña la polaridad, pero también influyen la viscosidad y otras características que pueden afectar al funcionamiento del detector (absorción UV, índice de refracción,...). En la cromatografía de intercambio iónico son importantes la fuerza iónica y el pH, mientras que en la cromatografía de exclusión, la consideración primordial es la solubilidad de la muestra en la fase móvil, y el peso molecular de las moléculas a separar.

Sin embargo, de entre todas estas técnicas de cromatografía líquida, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución ("High Performance Liquid Chromatography"), cuyas siglas anglosajonas HPLC designan universalmente esta técnica, sea muy probablemente la que mayor auge ha alcanzado en los últimos años. Las previsiones estadísticas demuestran que la técnica de HPLC seguirá su crecimiento exponencial, al menos hasta finales de la presente década. Este

aumento se ve reflejado además, en la bibliografía especializada, con referencias acerca de la variedad y complejidad de muestras separadas, velocidad y optimización de las separaciones logradas, diversidad de equipos instrumentales, etc..., lo que hace de la HPLC una técnica idónea en el análisis cuali y cuantitativo de productos naturales (Hostettmann *et al.*, 1986; Banijamali & Mariyannis, 1987; Marston *et al.*, 1988; Schuster, 1988).

En los apartados siguientes, se trata con mayor detalle y extensión, de las técnicas de cromatografía líquida utilizadas en la presente Memoria.

II.2.1.1.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

En 1958, Stahl demostró la amplia aplicabilidad de la cromatografía en capa fina (CCF), técnica que había sido conocida en principio, muchos años antes de su desarrollo. En la actualidad, la CCF ha alcanzado un éxito notable en la separación de mezclas de productos naturales, quedando constituida como un método analítico de gran utilidad para este fin.

Además de su aplicación analítica, puede tener también fines preparativos, en cuyo caso supone una técnica complementaria con otras utilizadas en el aislamiento de productos naturales.

II.2.1.2.- CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

El avance de las técnicas de cromatografía en columna (CC) ha supuesto un paso importante en la metodología de la cromatografía líquida preparativa, siendo empleada ya en numerosos laboratorios (Leutert & Von Arx, 1984; Hwu *et al.*, 1987; Zogg *et al.*, 1989). Se trata de técnicas sencillas y efectivas, con las que se consigue una máxima resolución en la separación.

De entre ellas, la "flash" cromatografía y la cromatografía líquida de media presión (en su denominación anglosajona MPLC), son quizás las más utilizadas, ya que se trata de técnicas de fácil manejo y bajo coste, presentando la ventaja del ahorro de tiempo y mayor proporción de muestra separada (Hostettmann *et al.*, 1986).

En ambos casos la muestra, perfectamente disuelta en la fase móvil, es introducida en la columna por su parte superior. En la "flash" CC, el eluyente es impulsado por la presión ejercida por un aireador, y con la ayuda de una bomba de pistón en el caso de la MPLC.

La "flash" cromatografía es la técnica de separación utilizada en los primeros estadios del fraccionamiento de un extracto vegetal. Consiste en separar una mezcla compleja, en función de volúmenes de eluyente de polaridad creciente. Como fase estacionaria se suele utilizar silicagel de tamaño de partícula bastante grande, con un flujo de eluyente considerable (alrededor de 10-20 ml/minuto).

La MPLC constituye quizás la técnica de CC con mejores resultados inmediatos. En esta técnica, la resolución es mayor, ya que se emplean presiones más elevadas que en la "flash" cromatografía, con objeto de conseguir velocidades de flujo adecuadas. Requiere la utilización de un sistema de bombeo, que suele ser una bomba de émbolo, peristáltica, o simplemente aire comprimido.

En el siguiente cuadro (tomado de Hostettman *et al.*, 1986), esquematizamos las condiciones de ambas técnicas de CC, "flash" cromatografía y MPLC, frente a la clásica CC abierta.

	^a (mm)	^b (bares)	^c (ml/min)	^d (R _s)	^e (min)
CC abierta	63-200	0	25	1.5	64
flash CC	40-63	0.75	100	1.6	9
MPLC	25-40	12	140	3.4	12

^atamaño de partícula

^bpresión

^cvelocidad de flujo

^dresolución

^etiempo

IL2.1.3.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) constituye hoy en día una de las técnicas cromatográficas más útiles para la separación de mezclas complejas de sustancias orgánicas. El abanico de compuestos que han sido separados con éxito por HPLC ha venido aumentando a un ritmo vertiginoso durante la última década, teniendo también especial incidencia en el campo de la química de productos naturales. Por otro lado, este incremento en el alcance y versatilidad de la HPLC ha sido favorecido por una mejor disponibilidad en el mercado de la instrumentación necesaria, y un perfeccionamiento en la efectividad y naturaleza de las columnas.

Las múltiples aplicaciones de la HPLC son extensas, e incluyen el aislamiento de productos naturales, de lo que queda constancia en diversas revisiones bibliográficas realizadas a lo largo de las últimas décadas (Kingston, 1979; Hostettmann & Hostettmann, 1985).

Las ventajas de la HPLC frente a la cromatografía líquida en columna son numerosas. Por un lado, en HPLC el proceso cromatográfico es sumamente rápido, pudiéndose resolver mezclas muy complejas en pocos minutos. Igualmente, se puede lograr la resolución de sustancias con un amplio margen de pesos moleculares. Asimismo, la HPLC permite la separación de sustancias termolábiles.

En HPLC se dispone de diversos parámetros a medir. Con objeto de simplificar esta exposición únicamente se abordarán los parámetros más útiles a contrastar, a la hora de observar un cromatograma (medida del número de moléculas detectadas-en ordenadas-frente al tiempo-en abscisas-transcurrido desde la inyección).

Por un lado, se encuentra el **tiempo de retención (t_R)**, que define el tiempo que tarda en eluir (en realidad, el tiempo que tarda en llegar al detector) una molécula. Pero el t_R tiene una serie de limitaciones inherentes a su propia definición. Por un lado, solo puede emplearse como parámetro cualitativo cuando se utiliza un sistema cromatográfico con unas condiciones determinadas y constantes (velocidad de flujo, fases empleadas, temperatura, etc...). Cualquier variación en alguno de estos parámetros hace que los t_R obtenidos no sean los mismos en un análisis que en otro.

Por otro lado, si la muestra a analizar es una mezcla de sustancias, puede que no exista solapamiento entre ellas, es decir, resolución máxima; pero si hay solapamiento, será preciso, además del t_R de cada banda, definir la **resolución** de cada una de ellas, con la anterior y posterior. Para ello, normalmente se procede a comparar el t_R de cada sustancia con el valor de t_R de una serie de sustancias patrones, de las cuales se sospecha su presencia en la muestra problema.

La pérdida de resolución significa pérdida potencial de separar al máximo una mezcla compleja de moléculas, obteniendo picos cada vez más solapados. La resolución en HPLC depende de tres factores.

Por un lado, la **constante de capacidad de la columna** (K'), que se define con el siguiente parámetro, para los distintos periodos de trabajo de la columna:

$K' = t_R - t_0 / t_0$, donde t_0 , es el tiempo que tarda en emerger la fase móvil.

Si la retención continúa aparentemente igual, significa que en la columna no se han deteriorado los mecanismos de captación competitiva, es decir, las fuerzas de adsorción, partición, iónicas o la distribución de sus poros. Si la retención disminuye, los lugares activos de la columna se encuentran ocupados por moléculas altamente retenidas. Es necesario realizar una purificación, con objeto de desaturar la columna. Por el contrario, si la retención se incrementa, es debido a un deterioro de la columna, que implica la aparición de otras fuerzas, además de las propias de la columna.

La resolución del cromatograma también está en función de la **selectividad y eficiencia** de la columna. El parámetro selectividad expresa la relación de las K' de las dos fases. Una pérdida de selectividad indica que la columna se comporta de distinto modo frente a un cambio de condiciones, es decir, de fases, por lo que quedaría en duda su reversibilidad.

La eficiencia de la columna disminuye cuando la distribución de las partículas del relleno pierde homogeneidad, debido a diversos factores: por el uso y el consiguiente ingreso de partículas ajenas de solventes y muestras no filtradas, el empleo de fases móviles reactivas o con oxígeno, humedad ambiental, etc...

Con la incorporación de detectores cada vez más perfeccionados a la salida de la HPLC, se llegó al análisis cuantitativo de las muestras. El amplio desarrollo observado en el campo de los detectores, registradores e integradores, hacen que en la actualidad, la HPLC sea una técnica de precisión superior a otras, como la cromatografía de gases o la electroforesis.

El pico cromatográfico representa una gaussiana, es decir, una distribución de moléculas que eluyen a lo largo del tiempo. La cuantificación del pico conlleva la evaluación del número de moléculas de cada soluto (cada pico), y por tanto, la cantidad o concentración de la misma.

Para evaluar el número de moléculas, es necesario conocer el área del pico. Como no siempre se dispone de un integrador capaz de evaluarla, y los picos cromatográficos son muy agudos, en ocasiones se emplea la altura del pico como medida cuantitativa. Sin embargo, aunque es el parámetro más cómodo y rápido de medir, la altura del pico, es decir, la distancia lineal existente entre la línea base y el máximo de la gaussiana, se ve afectado decisivamente por la mejor ó peor resolución de un pico respecto a los vecinos. Además, es un parámetro válido exclusivamente para picos simétricos.

Por ello, el mejor método consiste en medir el área de la curva comprendida entre los márgenes del pico y la línea base, lo que implica una resolución máxima en el cromatograma. Actualmente, el modo más difundido de medir el área del pico es mediante un integrador electrónico, acoplado a un aparato de registro. En equipos de HPLC tecnológicamente más avanzados se dispone de un microordenador, con lo que la precisión de la técnica es máxima.

IL2.1.4.- CROMATOGRAFÍA DE GASES

El empleo de una fase estacionaria líquida y una fase móvil gaseosa, fué primeramente sugerido por Martin y Synge en 1941, y desarrollado años más tarde por James y Martin, para la separación de ácidos grasos. En la actualidad, la cromatografía de gases (CG) es ampliamente utilizada en todos los campos de la química analítica.

En la CG, la muestra ha de ser lo suficientemente volátil como para poder ser transportada por la fase móvil gaseosa, lo que requiere, por lo general, una elevada temperatura de la columna. En muchos casos, se hace necesario incrementar la volatilidad de los compuestos, por medio de una derivatización eficiente.

La fase estacionaria líquida está embebida de un material inerte, comunmente kieselgur parcialmente fundido. Es esencial para el soporte inerte, un tamaño de partícula uniforme, que debe ser lo más pequeño posible para lograr una superficie amplia, pero lo suficientemente grande para permitir el relleno uniforme de la columna.

La elección de la fase estacionaria está condicionada por la temperatura a la que la columna ha de operar, y la naturaleza del material que se va a fraccionar. Esta temperatura de operación de la columna es fundamental. En los equipos más modernos, disponibles a nivel comercial, la temperatura puede ser programada, de manera que aumenta a medida que avanza la cromatografía. Esto tiene la ventaja de que pueden obtenerse con una sola operación buenas separaciones de mezclas de compuestos con propiedades muy diferentes.

En lo que se refiere a otros componentes del cromatograma, la fase móvil es un gas inerte, siendo los más empleados, hidrógeno, nitrógeno, helio y argón. La velocidad de flujo del gas es un factor importante. Un flujo demasiado elevado es causa de separaciones incompletas, mientras que si es demasiado lento, dará altos tiempos de retención y máximos difusos. Una velocidad de flujo típica es entre 10 y 50 ml/minuto.

Por medio de un dispositivo de inyección apropiado, la muestra a analizar se introduce en la parte superior de la columna, y debe volatilizarse en el mismo momento que entra en contacto con la fase estacionaria. El gas que fluye de la columna es analizado por el sistema detector, que generalmente es de tipo diferencial: ionización de llama, ionización de argón, captura de electrones, etc...

Para contribuir a la identificación de los componentes de la mezcla, se utilizan sustancias patrones de referencia. El método clásico consiste en la comparación del tiempo retención de cada componente con las retenciones de los patrones, realizado en idénticas condiciones. En la práctica, el dato de retención más útil es la retención relativa:

$$R_{i,s} = V_{Ni}/V_{Ns} = T_{Ri}/T_{Rs}$$

donde, i se refiere al compuesto problema, s a la sustancia patrón, V_N es el volumen de retención absoluto, y T_R es el tiempo de retención ajustado.

La retención relativa de un compuesto es independiente de la longitud de la columna, del caudal del gas portador, y de la cantidad de fase estacionaria, dependiendo solamente de la temperatura y de la naturaleza de la fase estacionaria (Gascó, 1969).

II.3.- MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL

La espectroscopía constituye una poderosa herramienta para la determinación precisa de estructuras moleculares. Se trata de un proceso experimental en el que se miden las diferencias de energía entre los estados permitidos de un sistema, al determinar las frecuencias de la luz absorbida. En realidad, mide la cantidad de radiación que absorbe una sustancia a diferentes longitudes de onda.

Las moléculas y todas sus partes, se encuentran en constante movimiento: dan vueltas, sus enlaces vibran, e incluso los electrones se mueven. La molécula puede existir solamente en diferentes estados (estados cuantizados), que corresponden a contenidos discretos de energía. La diferencia de energía entre estados cuánticos correspondientes, depende del tipo de movimiento de que se trate.

La longitud de onda requerida para llevar a cabo una transición determinada, es diferente para los distintos tipos de movimiento. Es decir, que cada tipo de movimiento corresponde a la absorción de luz en una parte diferente del espectro electromagnético. Debido a que las longitudes de onda que se requieren son tan diferentes, es necesario una instrumentación distinta para cada región del espectro.

Las técnicas espectroscópicas (infrarrojo, masas, UV/VIS,...) son ampliamente utilizadas para la identificación de compuestos aislados de extractos vegetales, aportando información importante acerca de su estructura molecular.

En este caso, se han utilizado dos técnicas, a cuya instrumentación se tenía un acceso más disponible, y que han permitido un acercamiento considerable a la estructura de las moléculas aisladas. Por esta razón, sólo se abordará el estudio de estas dos técnicas espectroscópicas utilizadas: la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, tanto de protón como de carbono, y la espectroscopía infrarroja.

IL3.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) ha adquirido importancia en el campo de la química a partir de la década de los 50, aunque en este periodo de tiempo relativamente corto, se ha convertido en uno de los más importantes métodos espectroscópicos utilizados.

Esta técnica difiere de otras técnicas espectroscópicas, en que los estados que se examinan tienen energías diferentes en un campo magnético. Es decir, que las moléculas se colocan en un campo magnético potente para crear una diferencia de energías entre dos estados, que se detecta por absorción de luz de energía apropiada. En ausencia del campo magnético, todos estos estados diferentes tienen casi la misma energía.

El movimiento relacionado con la espectroscopía de RMN es el de "spin nuclear". Los núcleos de muchos átomos se comportan como si giraran en torno a un eje. Puesto que están cargados positivamente, dichos núcleos deben obedecer las leyes físicas de las partículas cargadas en rotación. Una carga en movimiento, positiva o negativa, está asociada a un campo magnético. En consecuencia, los núcleos en rotación se comportan como pequeñas barras magnéticas, es decir, dichos núcleos tienen asociados sus momentos magnéticos respectivos.

En ausencia de campos magnéticos, estos momentos se orientan al azar, pero poseen la propiedad de cuantización, de que bajo la acción de un campo magnético, sólo están permitidas ciertas orientaciones. El spin nuclear sólo puede tener dos valores: $+1/2$ ó $-1/2$. Cuando ciertos núcleos como el de ^1H ó ^{13}C se colocan en un campo magnético, sus momentos magnéticos tienden a orientarse con el campo (correspondiente al spin α ($+1/2$) de energía inferior), o en contra de él (spin β ($-1/2$) de energía superior).

Un imán alineado en contra de un campo magnético, posee un estado de energía superior al que se encuentra alineado con el mismo. Para los núcleos ^1H y ^{13}C , el estado de spin β (contra el campo) corresponde a un estado de energía más alto que el asociado al estado spin α . Si el sistema se irradia con luz de frecuencia o longitud de onda adecuada, un núcleo con el spin α puede absorber un cuanto de luz y convertirse en un estado de spin β de energía superior, proceso que se describe como "inversión de spin".

Un espectrómetro de resonancia magnética nuclear se describe esquemáticamente, como una muestra situada entre los polos de un imán. El campo magnético origina los dos estados de energía (correspondientes a los diferentes núcleos de la muestra). La muestra se irradia con ondas de radio, se fija la frecuencia, y se varía el campo magnético. A medida que el campo de cada tipo de núcleo alcanza el valor de resonancia, se absorbe la energía de las ondas de radio a medida que los espines nucleares "se invierten", y esta absorción se mide y registra en un gráfico. También se puede (y así se suele hacer en la práctica) fijar el campo magnético, y variar la frecuencia, cuyas diferencias se pueden medir más fácilmente que las diferencias de intensidad de campo.

En la práctica no se miden valores absolutos, sino que se comparan diferencias respecto a un estándar, generalmente tetrametilsilano (TMS). La unidad de medida utilizada es δ (partes por millón, ppm), y representa un desplazamiento químico a campo más bajo (frecuencias más altas) que el TMS. Por desplazamiento químico se conoce los cambios que se producen en la absorción, debidos al apantallamiento diamagnético. Los núcleos situados en diferentes entornos electrónicos (otros protones o número y naturaleza de los sustituyentes en el caso de la ^{13}C -RMN), experimentan diferentes grados de apantallamiento; experimentan un campo magnético inferior al que se aplica externamente, dando lugar a que la absorción de resonancia tenga lugar a frecuencias distintas.

La ^1H -RMN revela el número de entornos diferentes que rodean a los protones, y el número relativo de protones que compone cada grupo, mientras que la ^{13}C -RMN permite ver los carbonos. La diferencia fundamental es que en la ^1H -RMN, el isótopo ^1H es el más abundante, pero para la ^{13}C -RMN, el isótopo ^{13}C sólo representa el 1%. El más abundante es el ^{12}C que no posee espín nuclear. Esto hace que en el caso de la ^{13}C -RMN se requiera más cantidad de muestra que en la de ^1H -RMN. Sin embargo, tiene la ventaja de que al ser difícil que existan dos ^{13}C adyacentes en una misma molécula, no se producen acoplamientos espín-espín como ocurre en la ^1H -RMN, lo que simplifica la interpretación del espectro. Los acoplamientos espín-espín producen "escisión de señales", hacen que cada resonancia aparezca como un doblete, triplete, etc... La distancia entre dos señales en un multiplete, se llama constante de acoplamiento. Se designa como J , y viene expresada en Hz. También aporta información estructural. (Streitwieser, 1987).

IL3.2.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopía infrarroja (IR), aplicada a la identificación de productos naturales, es a menudo utilizada junto con otras técnicas espectrales y físicas.

Los átomos de una molécula no mantienen posiciones fijas unos con respecto a otros, sino que realmente "vibran" hacia atrás y hacia delante un valor que se aproxima al promedio de la distancia interatómica. Este movimiento de vibración está cuantizado.

A temperatura ambiente, la mayoría de las moléculas se encuentran en un estado de vibración más bajo. La absorción de luz de energía apropiada, permite a la molécula "excitarse" a un segundo nivel de vibración, donde la amplitud es mayor. En general, esta absorción de un cuanto de luz IR puede ocurrir solamente si el momento dipolar de la molécula es diferente en los dos niveles de vibración. Un cambio en el estado de vibración molecular de estas características, se denomina "activo en el IR". Cuanto mayor es el cambio en el momento dipolar, más intensa es la absorción.

Por definición, la región del espectro IR se divide en tres partes: el IR próximo (frecuencias comprendidas entre $12820\text{--}3333\text{ cm}^{-1}$), el IR medio ($3333\text{--}333\text{ cm}^{-1}$), y el IR lejano ($333\text{--}33\text{ cm}^{-1}$).

En la zona del espectro comprendida entre $400\text{ y }1800\text{ cm}^{-1}$ (IR medio), aparecen las bandas características de casi todos los grupos funcionales, siendo ésta región útil para la elucidación de estructuras moleculares. Normalmente, el espectro IR de una molécula es muy complejo, por lo que se utiliza la presencia o ausencia de una banda de absorción en una región determinada, como diagnóstico de la presencia o ausencia de un grupo funcional determinado, correspondiente a dicha banda.

III.- ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

III.1.- APARATO DIGESTIVO

El sistema digestivo tiene como función en el organismo, proporcionar las sustancias nutritivas, agua y electrolitos necesarios para su normal funcionamiento. Las distintas partes que lo constituyen, tienen una estructura y características adecuadas para cumplir con esta misión: desde la ingestión de alimentos con los procesos de masticación y deglución, el transporte del bolo alimenticio por el esófago hasta el estómago, donde se almacena y se mezcla con las secrecciones gástricas hasta constituir el quimo, la digestión y posterior absorción de las distintas sustancias, sobre todo en intestino delgado, y la formación de materias fecales y su almacenamiento en intestino grueso hasta su evacuación.

Todas estas funciones anteriormente esquematizadas, están reguladas de una forma muy compleja por una serie de mecanismos que interactúan entre sí. La inervación por el sistema nervioso autónomo (tanto simpático como parasimpático) presenta unas características especiales, que lo distinguen de la regulación de otros órganos (Flórez, 1992), y son:

- presencia de un sistema nervioso entérico virtualmente independiente del control nervioso central
- existencia de un gran número de neuronas intrínsecas
- diversidad de tipos neuronales y neurotransmisores que intervienen
- frecuencia con que una misma neurona tiene dos o más cotransmisores

Si se considera de forma esquemática la estructura de la pared del tubo digestivo, se pueden apreciar de fuera a dentro, las siguientes capas:

- serosa
- capa muscular longitudinal
- plexo mientérico
- capa muscular circular
- plexo submucoso
- muscular mucosa
- mucosa

Las neuronas intrínsecas se encuentran distribuidas en el plexo submucoso y en el plexo mientérico. Las neuronas mientéricas inervan el músculo circular y el longitudinal, y también en parte el plexo submucoso. Las neuronas submucosas inervan la capa muscular mucosa, y las células glandulares de la mucosa. El plexo mientérico regula principalmente los movimientos gastrointestinales, mientras que el submucoso regula la secreción y el flujo sanguíneo, y tiene funciones sensoriales (mecano, quimio y termorreceptores). Todos estos elementos efectores operan coordinadamente en forma de patrones estereotipados reflejos, originando cambios en la secreción, contracción, absorción y el flujo sanguíneo.

Respuestas a la estimulación del sistema nervioso simpático y parasimpático:

	Estímulo adrenérgico	Estímulo colinérgico
Estómago		
Motilidad y Tono	Disminución +	Aumento +++
Esfínteres	Contracción +	Relajación +
Secreción		Estimulación +++
Intestino		
Motilidad y Tono	Disminución +	Aumento +++
Esfínteres	Contracción	Relajación +
Secreción	Inhibición	Estimulación
Glándulas salivares		
	Estimulación K^+ y H_2O + Secreción amilasa +	Estimulación K^+ y H_2O +++

Los neurotransmisores implicados en las funciones gastrointestinales son acetilcolina y noradrenalina, pero además intervienen otras sustancias:

- 5-Hidroxitriptamina (5-HT): ejerce múltiples acciones al actuar sobre distintos tipos de receptores 5-HT
- Histamina: actúa sobre receptores H_2 , estimulando la producción de jugo gástrico
- Neuropéptidos:
 - Sustancia P, produce estimulación motora y secretora
 - Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP), relajante
 - Bombesina, contractora
 - Péptidos opioides: dinorfina, met-enkefalina y leu-enkefalina (contractores)

Otras sustancias implicadas en las funciones gastrointestinales son las hormonas de naturaleza peptídica, que actúan como mediadores locales:

- Péptido Y (inhibidor)
- Péptido inhibidor gástrico
- Colecistocinina (contractor)
- Somatostatina (inhibidor)
- Secretina (inhibidor)
- Neurotensina (inhibidor)
- Gastrina (estimulador)

Las prostaglandinas sintetizadas por la mucosa ven incrementada su producción en caso de agresión. Tienen una función protectora, incrementando la producción de moco y bicarbonato. A concentraciones más altas, inhiben la secreción de ácido clorhídrico y pepsina.

En la actividad gastrointestinal se pueden distinguir dos funciones principales:

- función motora
- función secretora

FUNCIÓN MOTORA

Dos son los tipos de movimientos del tubo digestivo: de mezcla y propulsores (principalmente peristaltismo). Los alimentos deglutidos, tras pasar por faringe y esófago, llegan al estómago a través del esfínter gastroesofágico, que se relaja para permitir su paso cuando una onda peristáltica de deglución sigue hacia abajo a lo largo del esófago. En condiciones normales, este esfínter se encuentra en contracción tónica para evitar el reflujo del contenido gástrico.

En el **estómago** se almacenan los alimentos, se mezclan con la secreción gástrica hasta obtener el quimo, y éste es impulsado hacia el intestino delgado. El peristaltismo del estómago tiene como finalidad fundamental mezclar los alimentos, aunque también tiene carácter

propulsor. El tono del estómago se reduce por reflejo vagal ante la llegada de alimento, permitiendo que las paredes se adapten a un mayor volumen.

En el vaciamiento gástrico tiene un papel importante el esfínter pilórico, normalmente cerrado. Permite el paso del quimo, forzado por una onda peristáltica antral, más fuerte que las ondas ordinarias. Los factores que intervienen en el vaciamiento (aumentándolo) son, por un lado señales nerviosas de distensión del propio estómago, y la hormona gastrina, liberada por la mucosa del antro. También intervienen factores duodenales: el reflejo enterogástrico, y la liberación de hormonas (PIG, colecistocinina, secretina, ...). En ambos casos, producen inhibición del vaciamiento cuando hay exceso de quimo en duodeno, o éste resulta irritante por su excesiva acidez, contenido en grasa o proteínas, etc...

En el **intestino delgado** también se producen contracciones de mezclado y de propulsión. Las ondas peristálticas son más rápidas en el duodeno, y van disminuyendo en yeyuno e íleon. Aumentan por la presencia de quimo en duodeno, y por el reflejo gastroentérico que aumenta la motilidad y también la secreción. Estas ondas peristálticas también producen la dispersión del quimo por la mucosa intestinal, además de su progresión hasta la válvula ileocecal. Esta válvula impide el paso retrógrado de materias desde el colon hacia el íleon. El quimo que se acumula al llegar a esta válvula, es impulsado cuando se intensifica el peristaltismo en el íleon por un reflejo gastroileal, que se produce cuando la persona toma nuevos alimentos. La hormona gastrina tiene acción relajante directamente sobre el esfínter ileocecal, favoreciendo el vaciamiento. Por otro lado, la distensión en el ciego, así como la presencia de sustancias irritantes, retrasa este vaciamiento.

Las funciones del **intestino grueso** son la absorción de agua y electrolitos del quimo, y el almacenamiento de materias fecales hasta su expulsión. Los movimientos son más lentos que en el intestino delgado, pero también son de tipo mezclador (haustros) y de propulsión (movimientos en masa). La aparición de estos movimientos depende de los reflejos gastrocólico y duodenocólico (distensión de estómago y duodeno). También se produce por irritación o distensión del colon. La defecación produce vaciamiento del contenido rectal por reflejos de defecación: reflejo intrínseco del propio colon, y reflejo parasimpático.

FUNCIONES SECRETORAS

Las glándulas presentes en el tubo digestivo producen ácido, enzimas digestivos o moco (que protege las mucosas). La estimulación de estas glándulas se produce por la presencia de alimento, estímulo nervioso (parasimpático), presencia de varias hormonas gastrointestinales, y la histamina (receptores H_2). También intervienen las prostaglandinas.

Secreción de saliva

Está formada por ptialina (α -amilasa), mucina (lubricante), y es rica en iones potasio. Se produce un volumen aproximado de 1 litro/día. Su pH oscila entre 6 y 7.4. Está regulada por mecanismos nerviosos.

Secreción gástrica

La mucosa gástrica tiene dos tipos de glándulas:

- las oxínticas o gástricas, que secretan ácido clorhídrico, pepsinógeno, factor intrínseco y moco
- las pilóricas, que secretan fundamentalmente moco, pero también cierta cantidad de pepsinógeno y gastrina

La secreción gástrica está regulada por mecanismos nerviosos y hormonales (gastrina). El estímulo vagal produce un aumento de la secreción de las glándulas gástricas, pero también produce liberación de gastrina, que a su vez aumenta la producción de jugo gástrico ácido. Esta hormona se libera también ante la presencia de alimentos.

Hay una inhibición de la secreción gástrica ácida por retroalimentación, cuando el pH disminuye por debajo de 2. También se produce inhibición por factores intestinales (por distensión del intestino o presencia de determinados productos). Esta secreción supone un volumen de aproximadamente 1.5 litros /día, y su pH oscila entre 1 y 3.5.

Secreciones del intestino delgado

En el duodeno se produce el vaciamiento de los jugos pancreáticos (enzimas digestivos, agua y bicarbonato), y biliares. En esta zona se producen grandes cantidades de moco, para proteger la mucosa. Repartidas por toda la superficie del intestino delgado, se encuentran las

criptas de Lieberkuhn, donde se elaboran las secreciones intestinales (1.8 litros/día, líquido acuoso con un pH de 7.5-8), que facilitan la absorción de sustancias desde el quimo. También aparecen enzimas digestivos en la secreción. La regulación se produce por estímulos locales (presencia de quimo en el intestino), y hormonales, así como estímulo vagal.

Secreciones del intestino grueso

La mayor parte consiste en moco, que contiene grandes cantidades de bicarbonato. Está regulada por estimulación táctil directa de las células mucosas, y por estímulos parasimpáticos. En casos de irritación en la zona, se produce la secreción de agua y electrólitos.

FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

Dentro de la amplia variedad de patologías gastrointestinales, destaca la **úlcera péptica** como una de las de mayor importancia. Básicamente se describe como una erosión de la mucosa producida por la secreción del jugo gástrico. Las zonas donde aparece con más frecuencia, son el principio del duodeno, y en el estómago.

La causa de su aparición está en un desequilibrio entre los agentes protectores y la secreción de ácido, bien por un aumento de la producción de este último, o por una disminución de los mecanismos de defensa contra él. En las úlceras duodenales, se ha observado un incremento de la secreción ácida, mientras que en las gástricas esta producción es normal, asociándose su aparición a una disminución de resistencia de la mucosa.

Aunque se desconoce la etiopatología de la úlcera, se sabe que determinados factores tienen influencia en su aparición:

- factores genéticos hereditarios (Boyd & Wormsley, 1987; Glise, 1990)
- factores psíquicos, como la ansiedad y el estrés (Mertz & Walsh, 1991; Schindler & Ramchandani, 1991)
- factores ambientales: dieta, tabaco, alcohol,... (Boyd & Wormsley, 1987; Glise, 1990)
- factores farmacológicos: empleo de antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs), cuyo efecto es doble por acción directa sobre la mucosa (Boyd & Wormsley, 1987; Lozano, 1988;

Schiessel *et al.*, 1990; Szabo & Golberg, 1990), e inhibiendo la síntesis de prostaglandinas (Rodes & Pique, 1991). Los corticosteroides también inducen la formación de úlceras.

Otro hecho a destacar, es el papel del *Helicobacter pylori* como agente etiológico de esta enfermedad, cuestión muy estudiada en los últimos tiempos, y que aunque parece cada vez más evidente, no está del todo aclarada (Clearfield, 1991; Collins, 1992).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el tratamiento farmacológico está orientado a la utilización de protectores o estimulantes de la protección de la mucosa (prostaglandinas: misoprostol, sales de bismuto, sucralfato); sustancias neutralizantes: antiácidos (sales de aluminio y magnesio fundamentalmente), o fármacos inhibidores de la secreción ácida:

- antihistamínicos H_2 : cimetidina, ranitidina, famotidina,...
- inhibidores de la H^+/K^+ ATP-asa: omeprazol, lansoprazol,...
- anticolinérgicos (pirenzepina), hoy en día ya en desuso

Para evitar recaídas se emplean tratamientos de mantenimiento con antihistamínicos H_2 .

La terapia de erradicación del *Helicobacter pylori* asocia antibióticos (amoxicilina, claritromicina, metronidazol + tetraciclina), con antiulcerosos (sales de bismuto, omeprazol).

La alta participación de la gastrina en la actividad gástrica, ha motivado la búsqueda de sustancias inhibitoras de esta hormona, aunque no se utilicen en terapéutica en la actualidad (Ishizaki *et al.*, 1971).

TRASTORNOS DE LA MOTILIDAD

Los trastornos del peristaltismo son fundamentalmente hipermotilidad e hipomotilidad. En el primer caso, en el estómago se produce un aumento del vaciamiento, pudiendo existir dolor cólico. También se pueden producir espasmos. Si el tono está disminuido, ocurre lo contrario, pudiendo incluso llegar a paralizarse.

A nivel intestinal, el resultado del hiper o hipoperistaltismo (junto a alteraciones de la secreción y reabsorción), se traduce en diarrea o estreñimiento. Los fármacos que tienen acción a este nivel son:

- antiespasmódicos: fundamentalmente anticolinérgicos (atropina, escopolamina, butil y metilescopolamina... y sus derivados sintéticos). También se utilizan en menor medida, sustancias con acción directa sobre el músculo liso, como la papaverina y mebeverina (musculotrópos).

- procinéticos o estimulantes de la motilidad: ortopramidas (cleboprida, metoclopramida...). Su acción obedece a un mecanismo complicado no bien conocido, aunque parece que tienen acción colinérgica directa. Algunos tienen también acción antiemética, por bloqueo de receptores dopaminérgicos. Estas sustancias se usan mucho también, en caso de reflujo gastroesofágico.

Estreñimiento

Cuando el tránsito de materias fecales por el intestino grueso es lento, se produce una disminución del número de deposiciones y una mayor dureza de las heces, al haber una mayor reabsorción de agua. El tratamiento consiste en el uso de sustancias estimulantes directas del peristaltismo, emolientes, lubricantes, osmóticos, o incrementadores del bolo intestinal.

Diarrea

Es la emisión de heces fluidas, generalmente unido a un aumento del número de deposiciones. En la actualidad el objetivo primario del tratamiento consiste en restablecer la secreción y reabsorción normales, dejando en segundo lugar el uso de sustancias que deprimen la motilidad intestinal. Cuando su aparición se asocia a un origen bacteriano, se pueden utilizar también antibióticos.

Entre los primeros cabe destacar el uso de sustancias modificadoras del transporte electrolítico (sulfasalazina). También se usan en casos graves, glucocorticoides.

Como inhibidores de la motilidad, se emplean opiáceos como codeína, loperamida y difenoxilato, y también anticolinérgicos.

Otro trastorno general del aparato digestivo es el **vómito**. Se trata de un proceso complejo que surge como respuesta a estímulos variados: distensión o irritación del estómago, acción de ciertas medicaciones (quimioterapia), mareo cinético, etc... Intervienen receptores colinérgicos, de histamina, de dopamina, y de serotonina. El tratamiento varía con la naturaleza del vómito. De uso general son las fenotiazinas y ortopramidas. También se usan anticolinérgicos, antihistamínicos H₁, antagonistas de serotonina, etc...

III.2.- HIPOGLUCEMIA

Los antidiabéticos orales, también llamados hipoglucemiantes orales, constituyen un grupo bien delimitado de medicamentos que tienen una indicación precisa, el tratamiento por vía oral de algunas formas de diabetes (no insulino-dependientes).

Sin embargo, este objetivo solo se ha logrado en parte, ya que a pesar de los avances alcanzados, continúa sin descubrirse el fármaco que pueda sustituir a la insulina.

La insulina es una hormona secretada por el páncreas que, junto con el glucagón y otros factores biológicos, regula el metabolismo hidrocarbonado del organismo, interviniendo también en la metabolización de los restantes principios inmediatos. La cantidad de glucosa en sangre está regulada por dos hormonas, insulina y glucagón, con efectos opuestos entre sí. Estas hormonas son secretadas por el páncreas (que tiene esta función, además de sus funciones digestivas).

A grandes rasgos, la insulina produce la captación de glucosa por las células, para su inmediata utilización o su almacenamiento en forma de glucógeno. Esto ocurre especialmente en hígado, tejido muscular y tejido graso. También interviene en el metabolismo de las grasas y proteínas. Además de la concentración de glucosa en sangre, hay otros factores que intervienen en la secreción de insulina:

- Aminoácidos: casi todos tienen un efecto estimulador, pero sobre todo la alanina. Cuando existe normoglucemia, la administración de aminoácidos no afecta apenas a la secreción de insulina, pero si hay hiperglucemia, la secreción de esta hormona puede duplicarse
- Hormonas gastrointestinales: producen un aumento de la secreción insulínica

El descubrimiento de la insulina y sus acciones terapéuticas, ha constituido una base fundamental para el tratamiento de la diabetes (Steiner *et al.*, 1968). Se considera como meta de la terapéutica insulínica, el conseguir la normoglucemia en el organismo de forma permanente. Sin embargo, aún no se ha conseguido este ideal, limitándose el tratamiento a la supresión de los síntomas diabéticos durante los plazos más prolongados posibles.

La búsqueda de nuevos hipoglucemiantes orales se frenó con el descubrimiento de la insulina, ya que al ser la carencia de esta hormona la causa de la diabetes, se pensó en una terapéutica de suplencia capaz de normalizar el metabolismo glucosídico alterado.

Sin embargo, el empleo de medicamentos para disminuir las cifras elevadas de glucemia es anterior al descubrimiento y uso de la insulina, cobrando mayor auge con la introducción de las sulfonilureas como fármacos antidiabéticos; también se utilizan aunque en menor medida las biguanidas.

El impacto producido en clínica por los hipoglucemiantes orales, ha sido realmente espectacular durante las últimas décadas. En poco más de 10 años, se han convertido en medicamentos de uso general, y en la actualidad millones de diabéticos se han visto liberados de la necesidad de la inyección diaria de insulina. Indudablemente, este tipo de medicación facilita el mantenimiento de la normoglucemia, al menos de una forma relativa, y con ello la mejoría clínica del diabético. El éxito obtenido con estas sustancias, ha estimulado la búsqueda de nuevas estructuras químicas con actividad hipoglucemiante, así como de nuevas vías terapéuticas, como el control de la absorción intestinal de glucosa con diferentes productos (acarbosa).



MATERIAL Y MÉTODOS

I.- PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

I.1.- RECOLECCIÓN

La especie objeto de estudio de esta Memoria, *Sanguisorba minor* (Scop.) ssp. *magnolii* Spach., fué recolectada durante los meses de Abril-Mayo de 1987-1989, periodo de máxima floración, en la finca Vista Alegre, perteneciente al municipio de Retamoso, en la provincia de Toledo, así como en el término de Rozas de Puerto Real (Madrid).

Un pliego testigo de este taxon fué depositado en el Herbario del Departamento de Botánica, de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (MAF nº 126754).

I.2.- DESECACIÓN

Para evitar cualquier tipo de alteración que pudiera afectar a la composición de la planta, la droga fué convenientemente desecada en estufa a una temperatura de 40-45°C, durante aproximadamente media hora.

A continuación, se procedió a separar los tallos y hojas del resto del material vegetal, parte de la planta con la cual se van a realizar las investigaciones, al ser éstas las utilizadas a nivel popular.

I.3.- MOLTURACIÓN

Una vez desecado el material vegetal, se procede a su molturación en molino de martillo (Royal Triumph), hasta tamaño de partícula adecuado.

El material así pulverizado, se almacena adecuadamente en un lugar desprovisto de humedad y luz directa, hasta su posterior utilización.

II.- ESTUDIO HISTOLÓGICO

El hecho de que las diferentes sub-especies de *S. minor* sean de difícil diferenciación, obliga a comenzar estas investigaciones con un estudio histológico, que sirva para facilitar la clasificación de la *S. minor magnolii*. Estos datos podrán ser el punto de partida de un estudio histológico comparativo a realizar con las otras sub-especies, que bien podría facilitar la diferenciación de estos táxones.

Se analizan hojas y tallos, por ser la parte aérea la que se utiliza popularmente, y el fruto, por ser el que permite la diferenciación macroscópica de las sub-especies.

II.1.- PREPARACIÓN DE LOS CORTES

Se parte de planta fresca (estudio de hojas y tallos), y también planta desecada (tallos y frutos). En este último caso, hubo que proceder a su ablandamiento, por inmersión en agua fría durante 24 horas, o por calentamiento durante 30 minutos.

Los cortes se realizaron usando un microtomo de mano.

II.2.- REACTIVOS

Reactivos de aclarado

Se utilizaron para facilitar la observación de los diferentes órganos y tejidos, por disolución de las materias colorantes naturales:

- Hidrato de cloral en soluciones acuosas concentradas (Trease & Evans, 1986)
- Hipoclorito potásico o sódico en solución acuosa (Cabo Torres & Pardo Garcia, 1958)
- Mezcla aclarante formada por hidrato de cloral/glicerina/agua (5:3:2) (Cabo Torres & Pardo Garcia, 1958)

Reactivos de tinción

Facilitan el estudio de determinados tejidos o contenidos celulares, utilizando sustancias selectivas para cada caso:

- Floroglucina clorhídrica al 1%: tiñe las paredes de las células lignificadas de color rojo carmín (Stahl, 1973)
- Cloroyoduro de zinc: tiñe las paredes celulósicas de azul violeta, y las lignificadas de amarillo (Stahl, 1973)
- Sudan III: tiñe grasas y aceites esenciales de color rojo-anaranjado. Los tejidos cutinizados y suberificados, al ser de naturaleza grasa, también se tiñen del mismo color (Trease & Evans, 1986)
- Lugol: el almidón toma color azul oscuro (Benigno Román, 1971)
- Eosina acuosa: los cristales de aleurona se tiñen de color rojo (Benigno Román, 1971)
- Azul de metileno: todas las células se tiñen de azul, excepto las cutinizadas (Cutler, 1978)
- Rojo de rutenio: las gomas y mucílagos se tiñen de color rosa (Cutler, 1978)

III.- ESTUDIO FARMACOLÓGICO

La identificación de nuevos principios activos naturales o sintéticos, o la búsqueda de otros efectos en productos ya existentes, determina la conveniencia de realizar un número importante y variado de pruebas biológicas en el laboratorio.

El estudio farmacológico experimental llevado a cabo con *S. minor magnolii*, está basado en corroborar las propiedades terapéuticas que se le atribuyen en medicina popular. En primer lugar, se han utilizado técnicas *in vivo* encargadas de evaluar su actividad sobre el aparato digestivo, técnicas que básicamente quedan desglosadas en:

- sialorrea
- úlcera
- secreción gástrica
- tránsito intestinal
- constantes metabólicas

Además de estos ensayos en animal entero encaminados a validar los usos populares de nuestra planta, se han realizado ensayos *in vitro*, utilizando órgano aislado como reactivo farmacológico, ensayos que pueden orientar hacia un posible mecanismo de acción.

A su vez, se ha estudiado la posible actividad hipoglucemiante de esta especie, dada las referencias encontradas en la bibliografía en especies próximas a ella (Villar *et al.*, 1986; Ivorra *et al.*, 1988; Reher *et al.*, 1991c).

Con objeto de simplificar la exposición de las pruebas farmacológicas realizadas con *S. minor magnolii*, se trata por separado cada uno de estos apartados, especificando en cada caso el material y método utilizados.

III.1.- PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

El extracto empleado en este estudio farmacológico experimental es la infusión al 5% de *S. minor magnolii*, al ser utilizada así a nivel popular. Se prepara según la técnica adoptada en la Farmacopea Española en su 9ª edición (1954).

III.2.- PRUEBAS SOBRE APARATO DIGESTIVO

III.2.1.- SIALORREA

Se realizan ensayos de sialorrea en ratones, para valorar la influencia de nuestra planta sobre la secreción salivar. Para ello, se utiliza la técnica del plano inclinado, que permite evaluar una posible actividad anticolinérgica. Esta técnica se basa en la observación del fenómeno de salivación, que se produce tras la administración de una sustancia colinérgica.

La sialorrea es inducida en ratones por administración oral de pilocarpina (2 mg/Kg) (Sigma), siendo suministrada tras la infusión (dosis de 190 mg/Kg) a los 30, 45 y 60 minutos. La medida de secreción salivar se realiza cada 5 minutos durante un periodo de media hora.

Con este fin, los animales son anestesiados, y colocados ventralmente sobre el plano inclinado (ángulo de inclinación de 10°), recubierto por papel de filtro cuadriculado. Cada 5 minutos, los ratones se desplazan una cuadrícula, señalando las manchas de saliva que van dejando.

La acción anticolinérgica se valora calculando el porcentaje de inhibición de la hipersalivación inducida por pilocarpina, referido al control.

III.2.2.- ÚLCERA

La frecuencia del cuadro ulceroso de etiología muy dispar, ha propiciado un abundante número de modelos experimentales para el estudio y screening de nuevas drogas con actividad antiulcerosa.

En nuestro caso, se han utilizado tres modelos de inducción de úlcera experimental aguda: ligadura de píloro, úlcera inducida por agentes ulcerogénicos, en concreto el fármaco indometacina, y etanol.

Material

Como reactivo animal se han utilizado ratas Wistar, hembras, de peso comprendido entre 200 ± 50 g, y agrupadas en lotes de 7 animales cada uno: un grupo control, otro tratado con la infusión de *S. minor magnolii*, y un lote de referencia tratado con ranitidina (Alpharma), fármaco de reconocida potencia antisecretora.

Las dosis administrada es de 190 mg/Kg de infusión, y vehículo en el lote control (prueba en blanco). En el caso de la ranitidina, la dosis es de 100 mg/Kg, disuelta en carboximetilcelulosa al 1% (Sigma). La vía de administración en todos los casos es la vía oral, utilizando para ello una sonda intragástrica.

Método

En las 48 horas precedentes al ensayo, los animales son privados de comida, manteniendo el suministro hídrico *ad libitum*. Los diferentes lotes son tratados con los productos a ensayar durante un periodo de 4 días. Al quinto día de la experiencia, se procede a la inducción de úlceras por tres modelos experimentales diferentes.

1.- Úlcera inducida por ligadura de píloro

Se sigue básicamente el método descrito por Shay *et al.* (1945). Los animales son anestesiados, procediéndose a la ligadura del píloro durante un periodo de 3 horas. Inmediatamente después de la ligazón, los productos en estudio son administrados por vía intragástrica. Transcurrido este tiempo, los animales son sacrificados, y se procede a la disección de sus estómagos.

2.- Úlcera inducida por fármacos

Seguimos básicamente el método propuesto por Bhargava *et al.* (1973). El fármaco ulcerogénico utilizado en este modelo es la indometacina (Sigma), a dosis de 50 mg/Kg disuelta en carboximetilcelulosa al 1%, y administrada por vía oral. El quinto día de la experiencia, todos los lotes de animales son tratados con el agente ulcérigeno. Tras un periodo de 5 horas, los animales son sacrificados, y sus estómagos extraídos.

3.- Úlcera inducida por etanol

En este modelo experimental, la lesión gástrica es inducida por la administración oral de etanol absoluto (2 ml/rata). Tras un periodo de 3 horas, los animales son igualmente sacrificados, y sus estómagos extraídos.

En los tres casos, los estómagos extraídos son abiertos por la curvatura mayor, y lavados repetidas veces con suero fisiológico, con objeto de eliminar contenido gástrico y restos sanguíneos. A continuación, se procede a medir los milímetros totales de lesiones ulcerosas, medida que es realizada siempre por el mismo investigador.

El aspecto de las úlceras es superficial y longitudinal, asignándoles una cuantificación numérica de acuerdo con la siguiente escala (Rainova *et al.*, 1988):

1= úlceras menores de 2 mm

2= úlceras entre 2-4 mm

3= úlceras entre 4-8 mm

4= úlceras mayores de 8 mm

5= perforación de la mucosa

Las petequias hemorrágicas y enrojecimiento son cuantificadas como 0.5 mm. El efecto de *S. minor magnolii* en estos tres modelos experimentales es expresado en términos de porcentaje de inhibición de la ulceración.

Adicionalmente, se calcula un índice de ulceración, el índice de Paul, según el siguiente parámetro: $I.P. = M \times N / 100$, donde M representa la media aritmética del número de úlceras por rata en cada grupo, y N el porcentaje de animales que presentan ulceración.

III.2.3.- SECRECIÓN GÁSTRICA

Una de las preparaciones más utilizadas en el screening de nuevas drogas con actividad antisecretora, es la perfusión del estómago de rata anestesiada, cuyo pH se registra de forma continua a lo largo del experimento, técnica que se ha utilizado en el presente estudio. Con este modelo experimental, pueden estudiarse los efectos producidos por estimulantes y depresores de la secreción gástrica.

Material

Como reactivo animal se han utilizado ratas Wistar, hembras, de peso comprendido entre 200 ± 50 g. La perfusión gástrica se realiza con una bomba peristáltica (Model 203, Scientific Inc.), registrándose el pH mediante un electrodo combinado Ingold, en conexión con un pH-metro Crison mod. 501.

Método

Se sigue básicamente la técnica descrita por Ghosh y Schild en 1958. Las 24 horas previas al experimento, los animales son privados de comida, manteniéndose el suministro hídrico *ad libitum*. Cada animal es anestesiado por vía intraperitoneal con uretano (Sigma) a la dosis de 1.25 g/Kg, practicándose a continuación una traqueotomía para que respire sin dificultad durante la experiencia.

En este momento, se practica una laparotomía, insertando una cánula a la salida del estómago, al nivel del duodeno, que nos permite recoger el contenido gástrico a la altura del píloro. El esófago se canula oralmente con una sonda de igual diámetro.

Una vez preparado el animal, se inicia la perfusión oral con NaOH $5 \cdot 10^{-5}$ N a una temperatura de 37°C , pH aproximado de 9.7, y a una velocidad de 2 ml/minuto. Este proceso de lavado se realiza durante 30 minutos, al cabo de los cuales se baja la velocidad de perfusión a 1 ml/minuto, valor que se mantiene durante toda la experiencia. El líquido de perfusión se recoge a la salida del estómago, registrándose el pH cada 5 minutos durante todo el experimento.

Una vez terminado el lavado del sistema, y cuando se consigue un pH constante entre 6 y 7 durante al menos 15 minutos, se comienza la administración de las sustancias problema.

Previa a la administración de la infusión, se aplica una solución de suero fisiológico (pH=7), y una solución del mismo pH que la infusión (pH=5.3), con objeto de extrapolar los resultados convenientemente.

El análisis de los resultados se realiza determinando las variaciones de pH para cada tratamiento.

III.2.4.- TRÁNSITO INTESTINAL

Debido al uso popular que se hace de *S. minor magnolii*, parece oportuno evaluar en el laboratorio el efecto sobre el tránsito intestinal ejercido por la infusión de esta planta. El tránsito del bolo alimenticio a través del intestino del animal de experimentación, se puede determinar administrando por vía oral una sustancia coloreada no absorbible, que pueda observarse macroscópicamente.

Material

Como reactivo animal se han utilizado ratones Swiss, machos, de peso comprendido entre 20 ± 5 g, y agrupados en lotes de 7 animales cada uno: lote control, tratado con la infusión (190 mg/Kg), y un lote de referencia tratado con atropina (5 mg/Kg) (Scharlau). Como sustancia no absorbible, se utiliza una suspensión de carbón activo al 1% en goma arábica.

Método

Se sigue básicamente la técnica descrita por Bryant *et al.*, (1957). Las 24 horas previas al ensayo, los animales son desprovistos de comida, manteniendo el suministro hídrico *ad libitum*.

Una hora después de ser administrados los productos en estudio, los animales reciben por vía oral la papilla de carbón activo (0,5 ml/animal). A los 60 minutos, los animales son sacrificados, extirpando el intestino delgado desde el duodeno hasta la válvula ileocecal. Tras extenderlo sobre papel de filtro, se mide en centímetros la longitud recorrida por el carbón activo, y la longitud total del intestino.

La valoración de los resultados se realiza atendiendo al porcentaje de progresión de la papilla de carbón activo en los lotes tratados, con respecto al lote control (prueba en blanco).

III.2.5.- CONSTANTES METABÓLICAS

Para completar este estudio sobre el aparato digestivo, es necesario medir otra serie de parámetros importantes, a tener en cuenta a la hora de valorar los resultados globales.

Con este fin, los animales de experimentación (rata) de los diferentes lotes, son aislados en cabinas individuales durante un periodo de 15 días, administrándoles diariamente los productos en estudio a la dosis habitual de 190 mg/Kg de la infusión y vehículo en el lote control. Durante este tiempo, se controlan los siguientes parámetros:

- evolución del peso de los animales, para detectar una posible acción orexígena y realizar curvas de crecimiento
- consumo de comida y bebida
- medida de orina y recuento diario del número de heces, para evaluar una posible actividad astringente

III.2.6.- ÓRGANO AISLADO

En la valoración biológica de nuevos fármacos, el empleo del órgano aislado como reactivo farmacológico puede aportar información importante acerca del mecanismo de acción del mismo.

Un órgano determinado o parte de él, extraído adecuadamente del animal de experimentación y colocado en un "baño de órganos", nos permite registrar las contracciones del mismo, proporcionándonos importante información, muy ventajosa respecto a los ensayos *in vivo*: si el fármaco interacciona con algún receptor específico, el rango de concentración en el que resulta activo, su potencia relativa (comparándolo con otros agonistas), así como las interacciones que pueden darse con otros fármacos que tienen afinidad por el mismo receptor.

Básicamente, el montaje de un baño de órganos consta de los siguientes elementos (Livingstone, 1968):

- **copa**, donde se dispone la preparación mediante un sistema de sujeción. Este elemento está inmerso en el baño, y debe permanecer lleno de solución nutritiva, cuya composición se aproxima a las condiciones fisiológicas del entorno del órgano en el organismo. El volumen de solución de fármaco añadido a la copa, no debe ser mayor del 10% del volumen total de la misma.
- **termostato**, para controlar la temperatura del baño, que tiene que ser la adecuada según la preparación. Este sistema debe de ser muy preciso, ya que oscilaciones de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ pueden afectar notablemente a la reactividad del órgano.
- **reservorio de solución nutritiva**, situado a mayor altura del baño, y que permite el llenado de la copa.
- **aireación** adecuada del órgano, a través de conducciones a partir de aireadores ó botellas de oxígeno o carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2).

- **sistemas de registro** de las contracciones del órgano. Pueden ser de diferentes tipos, desde la palanca isotónica, que es el sistema más elemental de amplificación, hasta el registro isotónico o isométrico, realizado a través de un transductor. En el registro isotónico, la respuesta del músculo se traduce en desplazamientos, sin modificación de una tensión inicial impuesta previamente. En el registro isométrico, la contracción se traduce en un aumento de tensión, sin cambio virtual en la longitud prefijada del preparado. En ambos casos, los cambios en el órgano son magnificados por un amplificador al que está conectado el transductor, y de ahí a un registrador.

Una de las ventajas que presenta el baño de órganos, es que la cuantificación de la respuesta es más precisa, pudiéndose valorar a través de las llamadas "curvas dosis-respuesta". Para la construcción de estas curvas, que relacionan la intensidad de la respuesta con la dosis añadida, pueden seguirse dos procedimientos distintos.

En el modelo acumulativo, las sucesivas concentraciones de un determinado agonista son añadidas al baño sin retirar previamente la anterior, por lo que se van acumulando concentraciones crecientes. El incremento de volumen de la copa, así como la cantidad real de fármaco que tenemos en la misma, deberán tenerse en cuenta a la hora de calcular la concentración en la curva dosis-respuesta.

En las curvas no acumulativas ó sencillas, cada dosis de fármaco se añade de un modo independiente, procediéndose cada vez al lavado de la preparación. Presentan la ventaja de que las dosis pueden aleatorizarse, pero el inconveniente de requerir más tiempo y solución nutritiva para obtener una curva dosis-respuesta completa.

De entre las preparaciones más empleadas en el estudio de la reactividad farmacológica del músculo liso, el intestino delgado es uno de los órganos más utilizados, dada la escasa ó nula actividad espontánea, a diferencia de lo observado en otros preparados. Este órgano es quizás el más ampliamente extendido en los test de screening no específicos, para el estudio de los efectos farmacológicos de extractos vegetales (Dey & Harborne, 1991).

Se trata de un músculo liso inervado por al menos 10 terminaciones nerviosas diferentes, por lo que una respuesta positiva puede ser indicativo de distintos mecanismos de acción farmacológica. Desde el punto de vista del bioensayo, resulta útil para valorar la contracción producida por agonistas como acetilcolina (actividad neurotrófica), y cloruro bórico (actividad

musculotropa), así como por la histamina. El uso de los correspondientes antagonistas selectivos, permite caracterizar la acción de éstos a nivel de receptores específicos.

Para el estudio *in vitro* de la actividad de *S. minor magnolii*, se ha escogido el duodeno aislado de rata como reactivo farmacológico, valorando los resultados en forma de curvas dosis-respuesta acumulativas.

Material

Como reactivo animal se han utilizado ratas Wistar, machos, de peso comprendido entre 250±50 g, y mantenidas en ayunas las 24 horas previas al experimento, manteniendo el suministro hídrico "ad libitum".

Las contracciones del músculo son registradas en un transductor Letica modelo Unigraph 1000-100 ISO, a una velocidad de 0.1 mm/segundo, realizándose un registro isotónico.

En el baño de órganos, el músculo es mantenido con adecuada aireación (95% O₂ y 5% CO₂), a una temperatura de 37°C, e inmerso en solución Tyrode como solución nutritiva, con la siguiente composición:

- cloruro sódico: 8 g/l
- cloruro potásico: 0.2 g/l
- cloruro magnésico: 0.1 g/l
- cloruro cálcico: 0.2 g/l
- fosfato monosódico: 0.05 g/l
- bicarbonato sódico: 1 g/l
- glucosa 1 g/l

Como sustancias agonistas hemos utilizado acetilcolina y cloruro bórico (Merck), y como antagonistas selectivos, atropina (Scharlau) y papaverina (Merck), respectivamente.

Método

Los animales son sacrificados de un golpe seco en la nuca, y posterior exanguinización mediante la sección de los vasos del cuello.

A continuación, se abre la cavidad abdominal y se localiza el duodeno, parte del intestino utilizada en esta preparación. Se toma un fragmento de varios centímetros, y se lleva a una capsula Petri con solución Tyrode atemperada y burbujeada con aire, donde se limpia cuidadosamente con la misma solución. Durante la limpieza, se hace circular una pequeña cantidad de líquido nutricio por la luz del duodeno, procurando no lesionar la musculatura intestinal con las pinzas, ó por excesiva presión durante el proceso.

Se corta un trozo de unos 2 cm y se monta en el baño de órganos, de modo que se registre la actividad de la capa muscular longitudinal. Dicho corte se realiza en bisel, de manera que al atar el órgano, la luz del intestino quede accesible al líquido nutricio y a los fármacos. Uno de los extremos se fija al fondo de la copa (26 ml), y por el otro se une a un transductor isotónico mediante una ligadura inextensible. La palanca se sobrecarga con 1 g, para contrarrestar la tensión del órgano. La preparación se deja estabilizar durante aproximadamente 30 minutos, hasta que la motilidad espontánea es uniforme y estable, procediéndose entonces a la administración de los fármacos.

Transcurrido este tiempo, se añaden los agonistas según la técnica de dosis acumulativas, para que alcancen concentraciones crecientes: $5.5 \cdot 10^{-7}$ M- $33 \cdot 10^{-7}$ M de acetilcolina (actividad neurotrópa), y $9 \cdot 10^{-6}$ M- $64 \cdot 10^{-6}$ M de cloruro bórico (actividad musculotrópa).

Al alcanzar el máximo de contracción muscular, que corresponde con la dosis submaximal de agonista, se lava el órgano repetidas veces con solución nutritiva. Antes de proceder a una nueva experiencia, se deja reposar durante unos 2 ó 3 minutos. A continuación, se añade una dosis única del antagonista selectivo : $1.5 \cdot 10^{-8}$ M de atropina, y $2.5 \cdot 10^{-4}$ M de papaverina, para la acetilcolina y cloruro bórico respectivamente. A los 5 minutos, se repite la curva con el agonista, adicionándole hasta la concentración submaximal antes empleada. De nuevo se lava el órgano repetidas veces, y se deja estabilizar durante aproximadamente 30 minutos.

La infusión de *S. minor magnolii* es añadida a las concentraciones de 20 mg y 40 mg. Tras un periodo de incubación de 10 minutos, se repite nuevamente la curva con el agonista. Los ensayos son realizados seis veces, empleando órganos de diferentes animales en cada caso. Los resultados se expresan como porcentaje de la contracción inducida por el agonista.

III.3.- ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

Se han encontrado en la literatura especializada, estudios acerca de las propiedades hipoglucemiantes de diversas especies del género *Sanguisorba*, especies botánicamente próximas a *S. minor magnolii* (Villar *et al.*, 1986; Ivorra *et al.*, 1988; Reher *et al.*, 1991c). Esta razón, y el hecho de que se consuma preferentemente como infusión después de las comidas, hace conveniente realizar un estudio acerca del efecto de la infusión de esta planta, sobre la glucemia en animales experimentación.

Material

Como reactivo animal se han utilizado ratones Swiss, machos, de peso comprendido entre 20 ± 5 g, y agrupados en lotes de 7 animales cada uno: lote control, tratado con la infusión (190 mg/Kg), y un lote de referencia, tratado con glibenclamida como sustancia patrón (10 mg/Kg) (Sigma). Los animales se mantienen en ayunas las 24 h previas al ensayo suministrando agua *ad libitum*.

Las medidas de glucosa en sangre se realizan en un aparato glucometer (Reflolux), utilizando tiras reactivas específicas para este fin.

Método

La actividad hipoglucemiante de los productos en estudio se determina en ratones normales y en ratones hiperglucémicos, a los que previamente se les ha suministrado oralmente glucosa (2 g/Kg).

Los animales son tratados por vía oral con los productos a ensayar, midiéndose la glucosa en sangre según el método de Nelson y Somogyi (1975). Estas medidas se realizan antes de la administración del tratamiento (glucosa basal), y en los 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores.

El efecto de la infusión es expresado en términos de reducción de la glucemia, en ratones normales e hiperglucémicos.

III.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todas las pruebas farmacológicas realizadas con *S. minor magnolii*, los resultados se expresan como media aritmética \pm error estándar medio.

La significación estadística de los lotes tratados respecto al grupo control (prueba en blanco), se realiza según el test de la *t*-Student (Domenech, 1982). Valores de probabilidad menores de 0.05 son considerados estadísticamente significativos.

IV.- ESTUDIO FITOQUÍMICO

IV.1.- SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Con objeto de acercarnos a la composición química de *S. minor magnolii*, se realizó un screening fitoquímico preliminar, encaminado a la caracterización de los principios a los cuales pueda deber su acción esta planta (Rodríguez, 1984). Por otro lado, estas pruebas se han realizado de una forma meticulosa, de manera que puedan servir como punto de partida de estudios quimiotaxonómicos del género. La metodología seguida para este fin está basada en la propuesta por Domínguez (1973) y Harborne (1984).

Adicionalmente a estas pruebas fitoquímicas generales, y aprovechando la circunstancia de que son técnicas suficientemente establecidas en nuestro laboratorio (Bermejo *et al.*, 1984 a, b; Sáez *et al.*, 1985 a, b, 1986), y de que se dispone de sustancias patrones para corroborar su identificación, hemos profundizado en otros principios activos presentes en la infusión. Se trata del reconocimiento cromatográfico de ácidos fenólicos y azúcares.

Los ácidos fenólicos son los compuestos polifenólicos estructuralmente más sencillos, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, mientras que los azúcares son moléculas presentes prácticamente en la totalidad de los extractos acuosos de plantas, formando parte de la composición química de moléculas heterosídicas.

Se realiza también un estudio cromatográfico de heterósidos flavónicos y saponínicos, moléculas que por las referencias bibliográficas encontradas en el género *Sanguisorba*, estarán muy probablemente presentes en nuestra infusión.

Solubilizados también en los preparados acuosos de las plantas medicinales están los aminoácidos. Se ha realizado un estudio cuali y cuantitativo de estos compuestos, dada su alta a en el reino vegetal, atribuyéndoles, en algunos casos, las propiedades biológicas de estas plantas (Hikino *et al.*, 1986; Afzal *et al.*, 1987; Girard *et al.*, 1988; Jimenez & Crews, 1990; Mütsch-Eckner *et al.*, 1993; Rudi *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1995).

Para completar este screening fitoquímico de *S. minor magnolii*, se realiza un estudio cualitativo de su aceite esencial, encaminado a identificar algunos compuestos terpénicos volátiles, que pudieran contribuir al efecto antiespasmódico de la infusión.

IV.1.1.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Material

Los ensayos cromatográficos se realizan con un macerado acuoso al 10% de tallos y hojas de *S. minor magnolii*, realizado en frío, facilitando la extracción con un agitador magnético.

Las sustancias patrones empleadas fueron proporcionadas por Sigma, mientras que los solventes utilizados (Panreac) fueron previamente rectificados en nuestro laboratorio.

Método

Partiendo de un extracto acuoso se realiza una extracción líquido-líquido con éter etílico. El extracto etéreo, convenientemente desecado y concentrado a baja temperatura y presión controlada, se reserva para la investigación de los **ácidos fenólicos libres**.

El extracto acuoso procedente de la fracción anterior, se fracciona en tres partes alícuotas: I, II y III. La fracción I, una vez eliminado el éter etílico interpuesto, es extraído de nuevo con acetato de etilo. En este extracto, se separan los **ácidos fenólicos combinados** (uniones tipo éter ó éster).

Con la fracción II se realiza una **hidrólisis ácida**, con objeto de romper las uniones C-O-C de las combinaciones fenólicas. La hidrólisis se realiza a reflujo, con ácido clorhídrico 2N durante 3 horas. A continuación, los ácidos fenólicos resultantes se extraen con éter etílico.

Con la fracción III se realiza una **hidrólisis alcalina**, con objeto de romper los enlaces éster que forman los ácidos fenólicos entre sí, ó con otros compuestos. La hidrólisis se realiza con NaOH 2N, en frío y durante 24 horas. Los ácidos fenólicos liberados, una vez neutralizado el medio, se extraen con éter etílico.

Todos los extractos resultantes de los procesos anteriores, se desecan con sulfato sódico anhidro, y se concentran a presión reducida y baja temperatura en rotavapor (Bucchi) hasta sequedad. El residuo resultante se disuelve en un pequeño volumen de metanol, para realizar el estudio fitoquímico.

La identificación de los ácidos fenólicos se realiza por técnicas cromatográficas, con la ayuda de sustancias patrones de referencia. En concreto, hemos utilizado técnicas de CCF, variando los soportes y solventes de desarrollo, así como los reveladores.

Fases estacionarias: (Merck)

- placas de celulosa microcristalina
- cromatofolios de silicagel fluorescente (60 F₂₅₄)

Fases móviles: (Paris & Murgu, 1970)

- ácido acético 3% y 15%
- benceno/metanol/ácido acético (90:16:8) (4:1:5)
- ácido clorhídrico 0.1N
- butanol/amoníaco 2N (1:1), capa superior
- butanol/etanol/agua (4:1:22)
- cloroformo/ácido acético (85:15)

Reveladores:

- vapores de amoníaco, observación bajo luz UV (365 y 254 nm)
- p-nitroanilina diazotada (reactivo de Swain): p-nitroanilina al 0.5% en ácido clorhídrico 2N (2 ml), 3 a 5 gotas de nitrito sódico al 5%, disueltas hasta 10 ml con acetato sódico al 20% . Observación al visible
- carbonato sódico al 15%, que modifica las coloraciones obtenidas con el reactivo de Swain. Observación al visible

Sustancias patrones: (Sigma)

- ácido cafeico
- ácido ferúlico
- ácido p-cumárico
- ácido protocatéquico
- ácido vainílico

- ácido siríngico
- ácido p-hidroxibenzoico
- ácido clorogénico
- ácido rosmarínico
- ácido sinápico
- ácido m-cumárico
- ácido homoprotocatéquico
- ácido cinámico
- ácido salicílico
- ácido gálico
- ácido o-cumárico
- ácido gentísico

IV.1.2.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AZÚCARES

Material

La extracción de azúcares se realiza por maceración directa del material vegetal con agua, en frío y durante 6 horas.

Las sustancias patrones de referencia fueron proporcionadas por Sigma, mientras que los solventes (Panreac) fueron previamente rectificadas antes de su uso.

Método

Seguimos básicamente la metodología establecida en nuestro Departamento, para la separación e identificación cromatográfica de estas sustancias (Bermejo & Gómez-Serranillos, 1982).

Los líquidos acuosos filtrados son tratados con acetato de plomo al 10% . El exceso de plomo se elimina pasando una corriente de SH_2 , hasta ausencia de precipitación. El gas interpuesto en el agua se elimina por aireación, evitando así posibles reacciones de reducción, concentrando a sequedad. La extracción de los azúcares se realiza con piridina.

Sobre los líquidos acuosos filtrados se corrobora mediante la reacción de Fehling, la presencia únicamente de azúcares, y no de otras sustancias reductoras.

La identificación de azúcares se realiza por técnicas cromatográficas, en concreto técnicas de CCF con la ayuda de sustancias patrones de referencia.

Fases estacionarias: (Merck)

- placas de celulosa microcristalina
- cromatofolios de silicagel fluorescente (60 F₂₅₄)

Fases móviles:

- acetato de etilo/piridina/agua (100:25:35)
- butanol/etanol/agua (2:1:1)
- cloroformo/metanol/agua (64:36:8)
- acetato de etilo/ácido acético/metanol/agua (60:15:15:10)
- butanol/ácido acético/éter/agua (9:6:3:1)

Reveladores:

- Ftalato de p-anisidina: 1.23 g de p-anisidina disueltas en 50 ml de etanol + 1.26 g de ácido ftálico hasta 100 ml con etanol (en caliente)
- Timol sulfúrico: 5 ml de ácido sulfúrico concentrado se añaden cuidadosamente a una solución de 0.5 g de timol en 95 ml de etanol. Posterior calentamiento en estufa a 120°C durante 15 o 20 minutos

Sustancias patrones: (Sigma)

- Galactosa
- Glucosa
- Fructosa
- Arabinosa
- Xilosa
- Ramnosa
- Manosa
- Ácido glucurónico
- Ácido galacturónico
- Ribosa
- Fucosa

Para comparar los resultados obtenidos por CCF se procedió al estudio de los azúcares por HPLC, con las siguientes condiciones de trabajo:

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (Waters) con detector de índice de refracción, y dos sistemas de columna diferentes.
- Columna Sugar Pack (30 cm x 6.5 mm de diámetro interno) rellena de gel polimérico.

Fase móvil: agua con acetato cálcico 0.1 mM, para estabilizar la columna

Temperatura: 90°C

Flujo: 0.6 ml/minuto

- Columna Lichrosorb 10-NH₂ chrompack (25 cm x 4.6 mm de diámetro interno).

Fase móvil: acetonitrilo/agua (80:20)

Temperatura: ambiente

Flujo: 1.7 ml/minuto

En ambos casos, se utilizarón sustancias patrones, que fueron proporcionadas por Sigma.

IV.1.3.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE HETERÓSIDOS FLAVÓNICOS

Material

La extracción del material vegetal se realiza con metanol en frío, seguido de metanol al 50%, para finalizar con agua. Se reúnen todos los líquidos, y se concentran en rotavapor hasta residuo acuoso.

Las sustancias patrones empleadas en el estudio cromatográfico fueron proporcionadas por Sigma, mientras que los solventes utilizados (Panreac), fueron previamente rectificados en nuestro laboratorio.

Método

Sobre el residuo acuoso anterior, se realiza una extracción líquido-líquido con éter etílico, hasta líquidos orgánicos incoloros. El éter etílico, convenientemente deshidratado, es concentrado hasta residuo seco y disuelto en un pequeño volumen de metanol. En este extracto metanólico estarán presentes las **geninas flavónicas libres** que existan en la planta.

Del extracto acuoso restante se eliminan por evaporación los restos de éter etílico, tratándose a continuación con alcohol butílico varias veces. Se reúnen los líquidos butanólicos y se concentran en rotavapor hasta residuo seco, disolviendo éste en metanol.

Este último extracto se divide en dos fracciones; en una de ellas, se investigarán los **heterósidos flavónicos**, y en la otra, se realizará una **hidrólisis ácida en placa** con objeto de identificar las **geninas** que intervienen en la estructura de los heterósidos.

La identificación de los heterósidos y geninas flavónicas en cada uno de los extractos se realiza por técnicas cromatográficas, con la ayuda de sustancias patrones de referencia. En concreto, hemos utilizado técnicas de CCF, variando los soportes y solventes de desarrollo, así como los reveladores.

Fases estacionarias: (Merck)

- placas de celulosa microcristalina
- cromatofolios de silicagel fluorescente (60 F₂₅₄)
- papel Whatmann nº1

Fases móviles:

- ácido acético 30% y 60%
- mezcla forestal: ácido acético/agua/ácido clorhídrico (30:10:3)
- butanol/ácido acético/agua (4:1:5)
- fenol/agua (30:10)
- benceno/ácido acético (3:2) (4:1)

Reveladores:

- observación a la luz UV (365 y 254 nm)
- tricloruro de aluminio en solución alcohólica al 2 ó 3%
- exposición de los cromatogramas a los vapores de amoníaco, o pulverización con carbonato sódico al 5% y observación para luz UV.

Para comprobar los resultados obtenidos por CCF sobre la naturaleza de las geninas que forman los heterósidos flavónicos se ha empleado la técnica de HPLC. Se analizan geninas separadas previamente por CCF preparativa.

Las condiciones de trabajo son las siguientes:

- Cromatógrafo líquido de alta resolución con detector UV/visible.
- Columna C₁₈ de fase reversa (4,6 x 220 mm).

Fase móvil: agua-ac. fórmico (20:1) 75%

acetonitrilo 25%

Flujo: 1,5 ml/min

Temperatura: ambiente

IV.1.4.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE HETERÓSIDOS SAPONÍNICOS

Material

La extracción de heterósidos saponínicos, se realiza por maceración directa del material vegetal con agua hirviendo.

Como sustancias patrón se utiliza el ácido torméntico, amablemente cedido por el Dr. Payá, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, mientras que los solventes de desarrollo (Panreac), fueron previamente rectificados antes de su uso.

Método

Los líquidos acuoso procedentes de la infusión se dividen en dos partes alícuotas: A1 y A2. La primera se concentra a baja presión y temperatura hasta residuo seco, el cual se recoge con metanol y se reserva para el estudio de los heterósidos saponínicos. Los líquidos de la parte A2 se hidrolizan con ácido sulfúrico 2N durante varias horas, se extrae con cloroformo y se lleva a sequedad, recogiendo el residuo con metanol.

El marco procedente de la extracción con agua se extrae de nuevo con etanol, constituyendo el extracto B, el cual se lleva a sequedad y también es recogido con metanol.

La caracterización de los heterósidos saponínicos y sapogeninas en los extractos se realiza por técnicas cromatográficas. En concreto, hemos utilizado técnicas de CCF, variando los soportes y solventes de desarrollo, así como los reveladores.

Fases estacionarias: (Merck)

- placas de celulosa microcristalina
- cromatofolios de silicagel fluorescente (60 F₂₅₄)

Fases móviles:

- butanol/ácido acético/agua (4:1:5)
- isopropanol/agua/ácido fórmico (80:15:5) (80:15:2)
- acetato de etilo/metanol/agua (60:30:5)
- acetato de etilo/piridina/agua (3:1:3)
- cloroformo/metanol (90:10) (95:5) (98:2)
- cloroformo/metanol/agua (65:35:10)
- cloroformo/tetracloruro de carbono/acetona (2:2:1)
- éter diisopropílico/acetona (95:5)
- ácido acético 2%
- acetona/hexano (4:1)
- cloroformo/acetona (4:1)

Reveladores:

- lámpara de luz UV (365 y 254 nm)
- Reactivo de Liebermann-Bouchard: anhídrido acético (5 ml) y ácido sulfúrico concentrado (5 ml) en 50 ml de etanol. Calentamiento posterior a la pulverización a 110°C durante 10 minutos
- Anisaldehído sulfúrico: 0.5 ml de anisaldehído + 10 ml de ácido acético glacial + 85 ml de metanol + 5 ml de ácido sulfúrico concentrado
- Anisaldehído-ácido fosfomolibdico: ácido fosfomolibdico (1 g) disuelto en 10 ml de anisaldehído sulfúrico. Posterior calentamiento en estufa a 100°C durante 5-10 minutos
- Vainillina sulfúrica: 20 ml de una solución de vainillina al 1% en etanol + 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado. Posterior calentamiento en estufa a 110°C durante 10-15 minutos
- Cloruro de antimonio al 25% en cloroformo, y posterior calentamiento en estufa a 100°C durante 10 minutos

IV.1.5.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINOÁCIDOS

Dadas las propiedades iónicas de los aminoácidos, que hacen peculiar sus sitios de acúmulo en los vegetales, es necesario la aplicación de una serie de procedimientos previos a su análisis.

En primer lugar, es necesario un procedimiento de extracción capaz de romper las membranas celulares, y obtener un extracto donde estén contenidos los aminoácidos en mezcla con macromoléculas, fundamentalmente proteínas, y compuestos de bajo peso molecular.

La etapa siguiente es de aislamiento, y debe conducir a una purificación de los aminoácidos, capaz de obtenerlos libres de otro tipo de sustancias con distinta naturaleza química. A este nivel, es posible realizar una identificación cuali y cuantitativa, empleando fundamentalmente técnicas de cromatografía de intercambio iónico (Balansard *et al.*, 1982; Desmaison & Tixier, 1984; Schuster, 1988).

Material y Método

Los patrones externos empleados para la identificación y cuantificación de los aminoácidos fueron proporcionados por Sigma, mientras que los solventes utilizados (Panreac), fueron previamente rectificadas en nuestro laboratorio.

La extracción de aminoácidos se realiza por maceración directa del material vegetal con metanol y ácido clorhídrico, a pH 3 y temperatura ambiente, en agitador magnético. La separación de los aminoácidos del resto de los componentes del extracto, se realiza en columna de intercambio iónico (resina catiónica Lewattit S 100), eluyendo con amoníaco 1M.

El estudio cromatográfico se lleva a cabo por HPLC (Waters) con columna de intercambio iónico, derivando previamente el extracto con OPA, y realizando la detección por fluorescencia. La fase móvil empleada es un gradiente de dos mezclas de solventes:

A.- citrato sódico/fenol/ácido clorhídrico a pH 3

B.- ácido bórico/citrato sódico/NaOH a pH 9.6

IV.1.6.- ACEITE ESENCIAL

La obtención del aceite esencial se realiza a través de destilación por arrastre en corriente de vapor de agua, ya que proporciona un aceite esencial de buena calidad para fines analíticos, y presenta gran facilidad de montaje a pequeña escala. La identificación de los componentes de la esencia se realiza por cromatografía de gases.

Material

- Aparato destilador Clevenger modificado
- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer, modelo Sigma 3B, provisto de detectores de ionización de llama y de conductividad térmica
- Columna capilar de silicagel fundida (30 m x 0.254 mm), utilizando como fase líquida Carbowax 20M
- Registrador-integrador Varian sp. 4270, con una velocidad de carta de 0.5 cm/minuto

Método

La extracción del aceite esencial se realiza mediante destilación por arrastre en corriente de vapor con reciclación de agua ("cohobación"), en un aparato Clevenger modificado.

El material vegetal, desecado y fragmentado, se somete a una "destilación en agua", conteniendo el agua de destilación, cloruro sódico a saturación. La esencia destilada es recogida paulatinamente, con objeto de evitar la acción perjudicial del contacto prolongado con el agua. El volumen total de esencia, leído directamente en el tubo de recogida, se expresa en tanto por ciento con respecto a peso de planta desecada (rendimiento = % v/p).

El aceite esencial así obtenido, se deseca con sulfato magnésico anhidro, y se trasvasa a viales que, después de gasear con nitrógeno para crear una atmósfera inerte, se guardan adecuadamente en nevera hasta su posterior análisis.

La identificación de los componentes de nuestra esencia se realiza por CG, con el material reseñado anteriormente, y con las siguientes condiciones de trabajo:

- gas portador: helio a una velocidad de flujo de 30 ml/minuto
- temperatura inyector: 250°C
- temperatura detector: 275°C
- volumen de esencia inyectados: 0.03 ml
- temperatura inicial: 70°C, isoterma durante 5 minutos, programada con aumento lineal de 2°C/minuto, hasta una temperatura final de 200°C.

La identificación se lleva a cabo por comparación de los tiempos de retención de cada componente del aceite esencial con el de los datos encontrados en la bibliografía.

IV.2.- AISLAMIENTO DE COMPUESTOS

IV.2.1.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Los estudios cromatográficos en capa fina realizados con la infusión de *S. minor magnolii*, nos permiten fijar las condiciones idóneas para una separación ó purificación posterior por CC.

Material

Fase estacionaria:

- cromatofolios de silicagel fluorescente (60 F₂₅₄) (Merck)

Fases móviles:

- cloroformo/metanol
- tolueno/acetato de etilo
- diclorometano/metanol
- hexano/acetona

Todos los solventes utilizados (Panreac) fueron rectificados en el laboratorio, ensayándose diferentes proporciones de cada mezcla.

Reveladores: (Wagner *et al.*, 1984)

- lámpara de luz UV (365 y 254 nm)
- vainillina sulfúrica
- anisaldehído sulfúrico
- reactivo de Liebermann-Bouchard

Método

Para el desarrollo cromatográfico se sigue la técnica propuesta por Stahl (1969), en sus modalidades uni y bidimensional ascendente.

IV.2.2.- CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

El fraccionamiento cromatográfico de la infusión de *S. minor magnolii*, se realiza siguiendo la técnica de "flash" cromatografía (Still *et al.*, 1978).

Material

Se utiliza el extracto B procedente de la extracción con etanol tras comprobar por CCF que la composición cualitativa de saponinas es similar al extracto acuoso.

- columnas de vidrio de las siguientes dimensiones: 30 mm de diámetro interno y 350 mm de altura de lecho, y 40 mm de diámetro interno y 800 mm de altura de lecho.

- **fase estacionaria:** silicagel 60 (Merck) para columna (0.040-0.063 mm de granulometría).

- **fases móviles:** se utilizan como disolventes de elución aquellos que nos permitan una separación adecuada del extracto, con una polaridad ajustada a las sustancias que pretendemos separar. Al tratarse de un extracto acuoso, la complejidad de la muestra es realmente alta, por lo que se sigue la técnica de gradiente de elución, con un aumento progresivo de la polaridad del eluyente: hexano/acetona (80:20), hexano/acetona (50:50), para finalizar con acetona sola.

Método

El empaquetamiento de la columna se realiza en seco. La fase estacionaria se estabiliza por humectación con la fase móvil. La muestra, totalmente disuelta en un pequeño volumen de fase móvil, se deposita en la parte superior. El eluyente es impulsado a través de la columna con la ayuda de un aireador, que permite conseguir presiones de aproximadamente 0.5 bares.

IV.3.- ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL: TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

IV.3.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

IV.3.1.1.- ESPECTROSCOPIA DE ^1H -RMN

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) nos permite identificar el número de protones presentes en la molécula, proporcionándonos información acerca de los grupos funcionales existentes en la misma.

Los espectros se han realizado en un espectrómetro Varian XL 400, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente, y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

IV.3.1.2.- ESPECTROSCOPIA DE ^{13}C -RMN

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C -RMN) nos acerca a la elucidación del esqueleto molecular, pudiendo identificar los radicales carbonados existentes.

Los espectros se han realizado en un espectrómetro Bruker AM 200, utilizando CDCl_3 como disolvente, y TMS como patrón interno.

IV.3.2.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los espectros se han realizado en un espectrofotómetro IR Perkin-Elmer modelo 283, compactando la muestra en pastillas de bromuro potásico.

V.- ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE COMPUESTOS AISLADOS

Con los compuestos aislados de *S. minor magnolii*, se planteó realizar un estudio farmacológico, con objeto de comprobar si realmente son las moléculas responsables de la actividad de esta planta.

Dado el bajo rendimiento obtenido con ellos, únicamente se realizan aquellas pruebas donde la infusión resultó ser efectiva, y que requerían una menor cantidad de producto a ensayar.

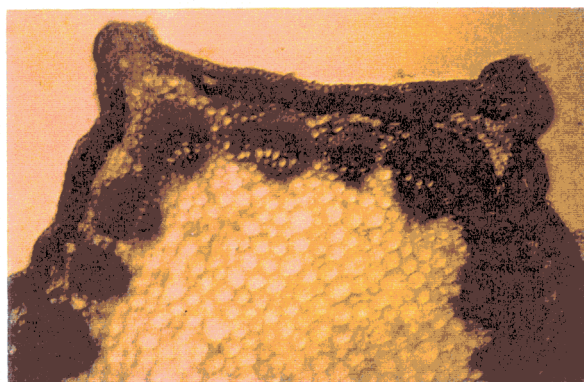
Así, se han realizado estudios para detectar una posible actividad hipoglucemiante, y ensayos en órgano aislado, según la metodología expuesta en los apartados III.3 y III.4, respectivamente. Las dosis de compuesto ensayadas fueron de 50 mg/Kg en los ensayos *in vivo* y de 5 mg y 10 mg en las pruebas *in vitro* de órgano aislado.

RESULTADOS

I.- ESTUDIO HISTOLÓGICO

I.1.- TALLOS

Tienen estructura pentagonal, con 5 costillas ó crestas muy marcadas; en algunos casos, estas costillas están divididas en dos. En un corte transversal, de fuera a dentro, encontramos:



Hidrato de cloral. Objetivo 8 x

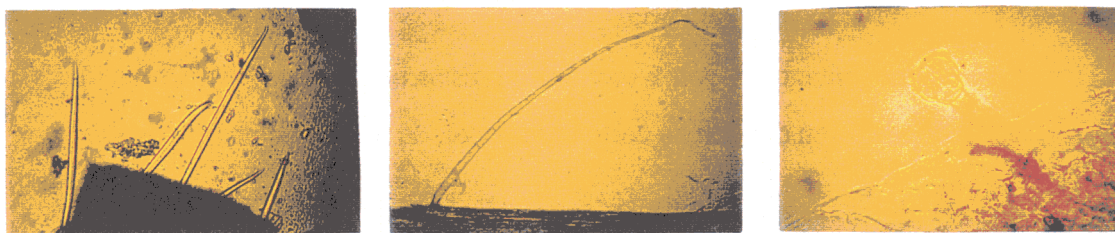
Epidermis formada por células más o menos redondeadas, con aspecto festoneado hacia el exterior, y con una cutícula bastante desarrollada. Estas células, en observación frontal, son alargadas y estrechas, de contornos regulares, con estomas de tipo anomocítico (ranunculáceo), sin células anejas, como cabe esperar al tratarse de una Rosacea (Metcalf & Chalk, 1965).



Hidrato de cloral. Objetivo 40 x

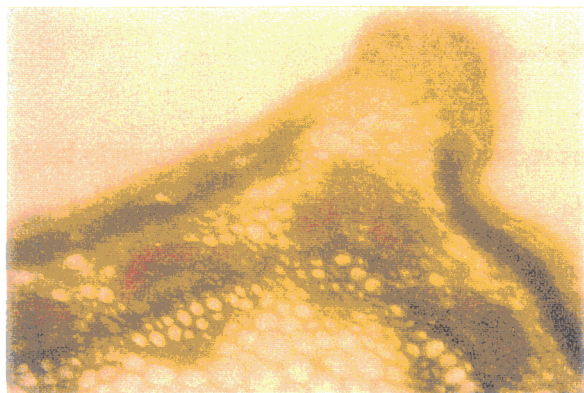
En esta epidermis, aparecen tricomas de tres tipos diferentes:

- tectores unicelulares muy grandes
- tectores pluricelulares uniseriados, formados hasta por 18-20 células
- glandulares con un pedúnculo de 4 células, y una glándula tricelular



Hidrato de cloral. Objetivo 10x

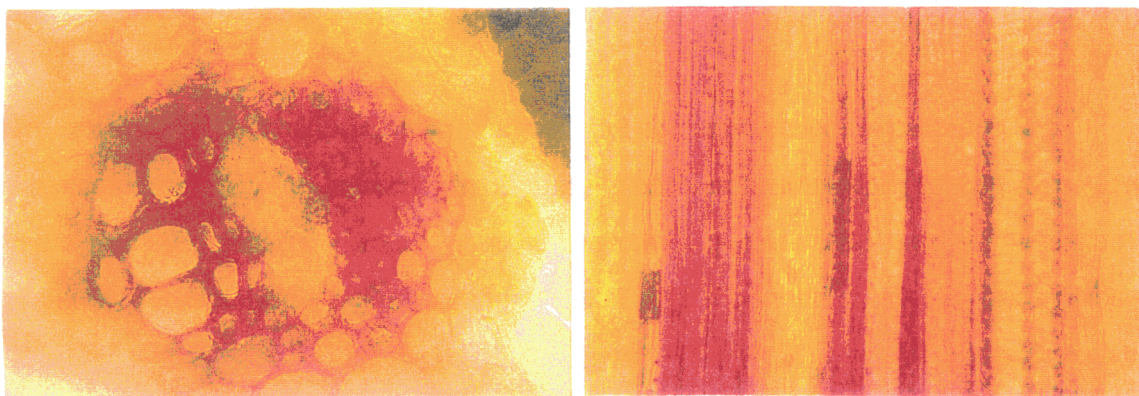
A continuación de la epidermis, aparece una segunda fila de células de la misma naturaleza, que constituye la **hipodermis**.



Floroglucina clorhídrica. Objetivo 10x

El cortex está formado por parénquima fotosintético (**clorénquima**), situado inmediatamente después de la hipodermis, y que se interrumpe a la altura de las costillas. Este clorénquima se sustituye en las costillas por tejido colenquimatoso, cuya función de sostén refuerza la estructura del tallo (Cortés, 1986).

Debajo existe **parénquima cortical de reserva**, que llega hasta el cilindro vascular. No se aprecia endodermis. Este **cilindro vascular** está constituido por haces, separados entre ellos por parénquima interfascicular que está lignificado, formando una eustela (haces colaterales), con el floema exterior al xilema (Fahn, 1978).



Floroglucina clorhídrica. Objetivo 40x

Por último, en el interior del tallo encontramos la **médula**, que en las proximidades del cilindro vascular, está ligeramente lignificada. En algunas de sus células, aparecen drusas de forma muy dispersa.

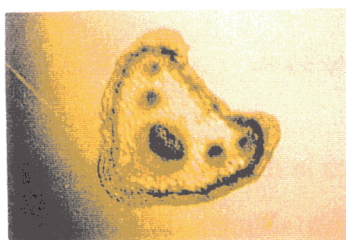
Esta descripción se corresponde con cortes histológicos realizados a media altura del tallo, y aunque la estructura fundamental se mantiene, encontramos, en la zona más baja, un clorénquima menos desarrollado, mientras que en las zonas extremas del tallo, cercanas al capítulo floral, al contrario, el clorénquima está muy desarrollado, no existiendo apenas parénquima de reserva entre éste y el cilindro vascular.

I.2.- PECIOLO

Tiene una estructura intermedia entre el tallo y la hoja. Presenta una sección triangular, con epidermis muy cutinizada, e hipodermis. También presenta clorénquima, interrumpido a veces en las costillas, las cuales están formadas por colénquima.

Todo el interior está formado por un parénquima homogéneo, con drusas dispersas, similar al que está formando la médula en los tallos, y en el cual se sitúan cinco haces vasculares; uno más desarrollado, que tendrá su continuidad en el nervio principal de la hoja, y dos a ambos lados, más pequeños.

Estos haces son concéntricos con el floema más desarrollado en la parte externa, pero que rodea al xilema totalmente (anficribal). Existen fibras extraxilemáticas protegiendo los haces vasculares, pero menos que en los tallos, y faltando por completo en muchas ocasiones. En la base de la hoja la estructura es similar, pero los haces vasculares se reducen a tres.



Hidrato de cloral. Objetivo 8x



Hidrato de cloral. Objetivo 10x

I.3.- HOJAS

Están formadas por 3-12 pares de foliolos, redondos ó elípticos, de 0.5-2 cm de tamaño, longitudinales, peciolados, e inciso-aserrados (Flora Europea, 1976).

Presentan mesófilo heterogéneo asimétrico, con la siguiente estructura:

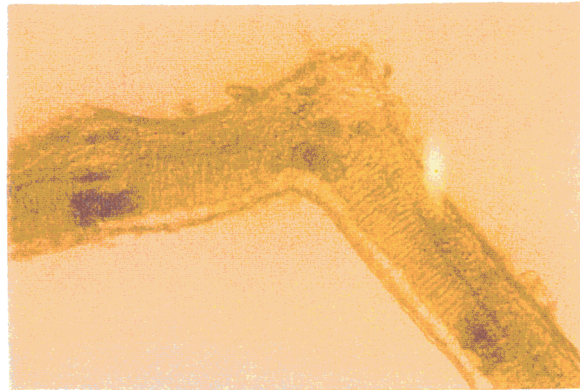
- **epidermis adaxial** muy gruesa, poco cutinizada. Vista frontalmente está formada por células rectangulares, de contornos regulares. Presenta algún estoma, pero ~~no~~ tricomas.



Hidrato de cloral. Objetivo 40x

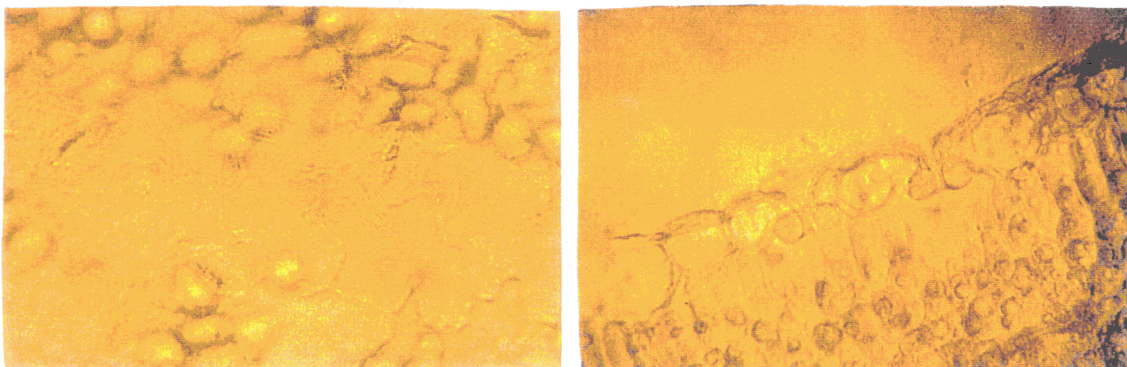
- **parénquima en empalizada**, formado generalmente por dos filas de células, a veces tres, alargadas, más grandes las de la fila más externa, con muchos cloroplastos.

- **parénquima lagunar**, con tres o cuatro filas de células redondeadas, irregulares, que también tienen cloroplastos.



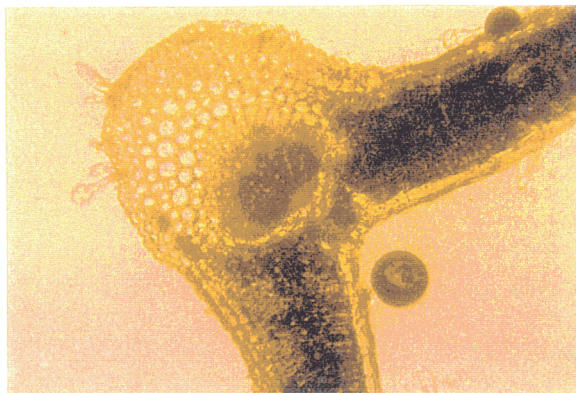
Hidrato de cloral. Objetivo 8 x

- **epidermis abaxial**, de células más finas, también poco cutinizada, salvo en la zona de las nerviaciones, sobre todo en el nervio medio, en el que la cutícula está más desarrollada. Sus células son más o menos isodiamétricas, de contornos irregulares y sinuosos. También tiene estomas en mayor número (hoja anfistomática) (Essau, 1982), y tricomas iguales que en los tallos, de los tres tipos.



Hidrato de cloral. Objetivo 40 x

- **nervio medio**, aparece como una prominencia convexa en la cara abaxial. En él se interrumpe el parénquima tanto lagunar como en empalizada. En su lugar se encuentra colénquima, que va de epidermis a epidermis rodeando al haz vascular concéntrico anficribal, al igual que en el peciolo. En la cara adaxial, recorriendo todo el nervio, existen numerosas drusas.

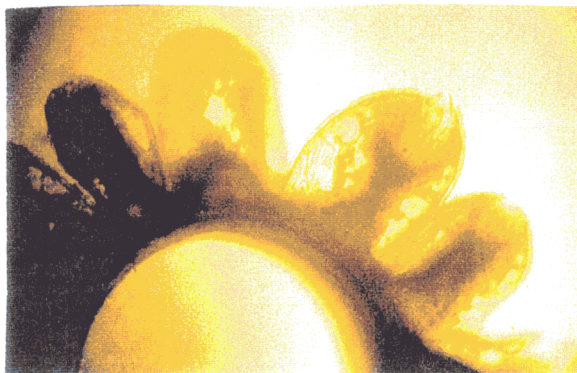


Hidrato de cloral. Objetivo 8 x

- **nervios secundarios**. Haz vascular rodeado por una vaina del haz parenquimático, conectada de epidermis a epidermis, por células semejantes: extensiones de la vaina del haz. También se encuentran depositadas, gran cantidad de drusas.

I.4.- FRUTO

Se trata de un aquenio, es decir, un fruto seco e indehisciente (Font-Quer, 1989). Tiene de 3-4 mm de alto x 2 mm de ancho. Sección circular. Aspecto externo fuertemente verrucoso.

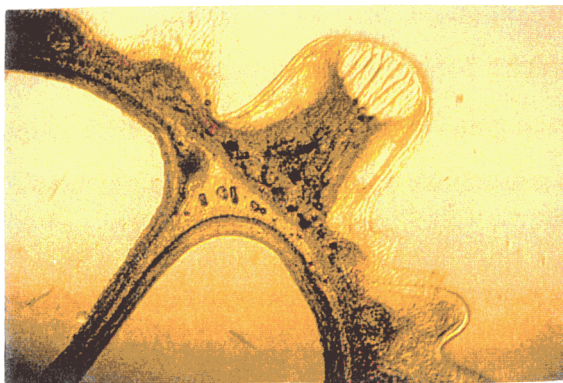


Hidrato de cloral. Objetivo 10 x

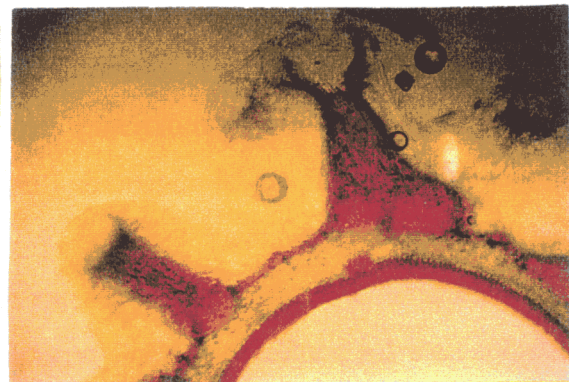
En un corte transversal, observamos, del exterior al interior:

exocarpo formado por:

- epidermis doble, con pequeños pelos unicelulares.
- capa de células muy lignificadas, que forma la estructura en las prolongaciones o alas, que dan ese aspecto verrucoso al fruto, y que tienen forma de copa. En el interior de estas formaciones, existen unas células alargadas, grandes, situadas perpendicularmente, y que contienen mucílagos. En su base aparece un anillo de fibras. Rodeando estas estructuras hasta la epidermis, hay células de naturaleza celulósica.



Hidrato de cloral. Objetivo 10 x

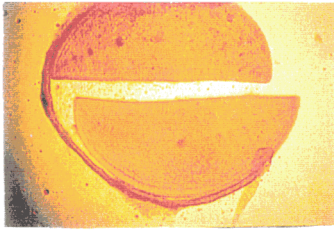


Floroglucina clorhídrica. Objetivo 10 x

mesocarpo, en cuyo parénquima se aprecian dos capas:

- capa de 3-4 filas de células, con cristales prismáticos en su interior.
- capa de 3-4 filas de células grandes, alargadas, de las cuales las más externas contienen almidón.
- capa de cristales prismáticos, que lo separa del endocarpo.

endocarpo: formado por pequeñas células alargadas, fuertemente lignificadas.



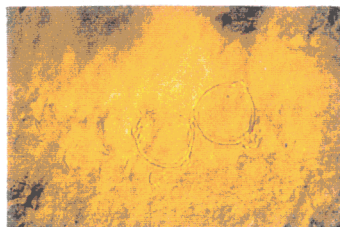
Sudan III. Objetivo 10 x

A continuación, se situa la semilla, sin dejar espacios vacíos, aunque se separa fácilmente, ya que sólo se une por un punto al pericarpo, al tratarse de un aquenio.

L5.- POLEN

Se trata de un grano zonotremo tricolporado. En las especies del género *Sanguisorba*, hay un paso a la anemofilia (carácter botánico más primitivo) (Strasburger, 1974). Esto requiere que se produzcan y dispersen gran cantidad de granos de polen, lo que implica la multiplicación del número de flores masculinas ó estambres, siendo mucho más numerosas que las femeninas.

Generalmente, es un polen seco, sin cemento polínico, de membrana lisa y pequeño tamaño. Esto les confiere una fácil separación unos de otros, y una alta capacidad de flotación en el aire.



Hidrato de cloral. Objetivo 40 x

II.- ESTUDIO FARMACOLÓGICO

Los ensayos farmacológicos se han realizado con la infusión al 5% de *S. minor magnolii*, que proporcionó un rendimiento de 5.7 g de extracto seco por cada 100 g de planta desecada.

II.1.- PRUEBAS SOBRE APARATO DIGESTIVO

II.1.1.- SIALORREA

En los ensayos de sialorrea inducida en ratones por administración de pilocarpina (2 mg/Kg), la infusión se ha mostrado efectiva frente al incremento de secreción salivar, con valores estadísticamente significativos, incluso cuando se administra una hora después el agente (Tabla 1). No obstante, el máximo porcentaje de reducción de la secreción (43.96%), se produce al ser administrada la pilocarpina, en la primera media hora tras la infusión.

TABLA 1. Efecto de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii* sobre la sialorrea inducida por pilocarpina en ratones Swiss.

Grupo (+ pilocarpina)	30'	45'	60'
Control	2.32±0.23	1.97±0.17	1.63±0.02
Infusión	1.30±0.02*	1.28±0.11*	1.18±0.06**
% Inhibición	43,96	35,02	27,60

Los datos corresponden a la media aritmética±error estándar medio de las medidas (en cm) de secreción salivar en lotes de 7 animales. Las sustancias problema se administran a los 30, 45 y 60 minutos anteriores a la pilocarpina.

t-Student: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

II.1.2.- ACTIVIDAD ANTIULCEROSA

La administración oral de la infusión de *S. minor magnolii*, previene de una manera significativa el efecto ulcerogénico inducido en ratas por ligadura de píloro e indometacina (Tabla 2).

TABLA 2. Efecto protector de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii* frente a la inducción de úlcera experimental en rata Wistar.

Ligadura píloro			Indometacina	
Grupo	$\bar{x} \pm \text{ESM}$	Índice Paul	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Índice Paul
Control	22.6 \pm 4.25	20.1	16.7 \pm 2.32	21.7
Ranitidina	3.26 \pm 0.04**	3.81	2.33 \pm 0.04**	2.81
Infusión	8.58 \pm 2.65*	8.92	4.00 \pm 1.27**	7.07

Los datos corresponden a la media aritmética \pm error estándar medio expresado en mm de úlceras en lotes de 7 animales.

t-Student: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

Los porcentajes de inhibición de la ulceración son próximos a los obtenidos con la sustancia de referencia, ranitidina, siendo ligeramente más marcados en el modelo de inducción de úlcera por indometacina (Figura 1).

En el modelo experimental de úlcera inducida por etanol, el carácter agresivo de este agente sobre la mucosa, provoca lesiones tan severas que hacen imposible su cuantificación numérica. Sin embargo, los estómagos de animales tratados con la infusión, presentan en general, un aspecto menos lesivo que en el caso de los lotes control.

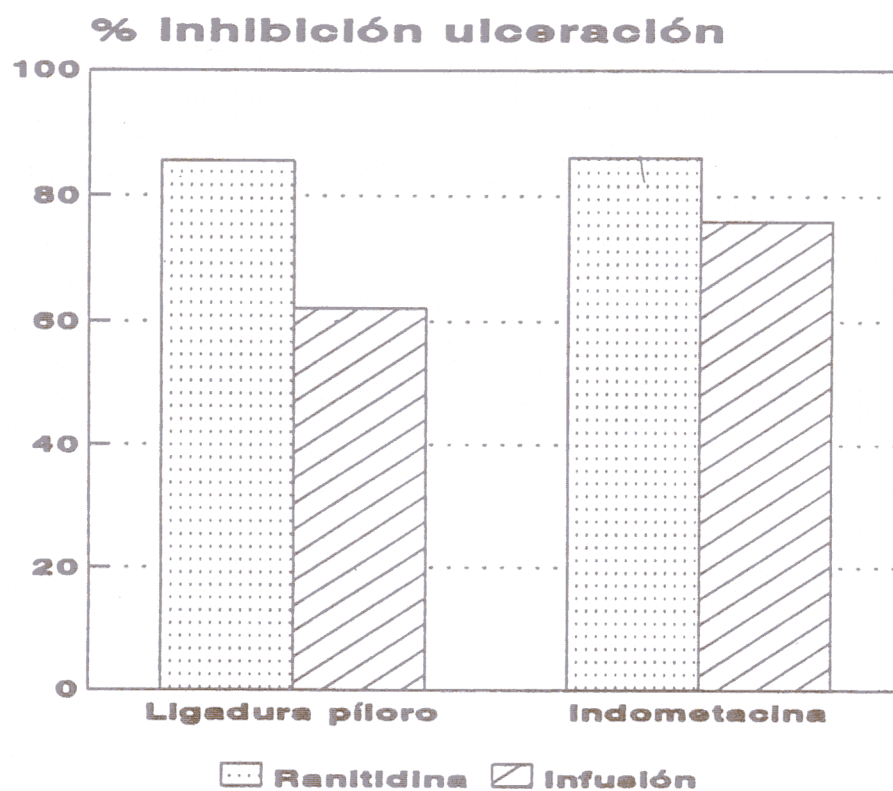
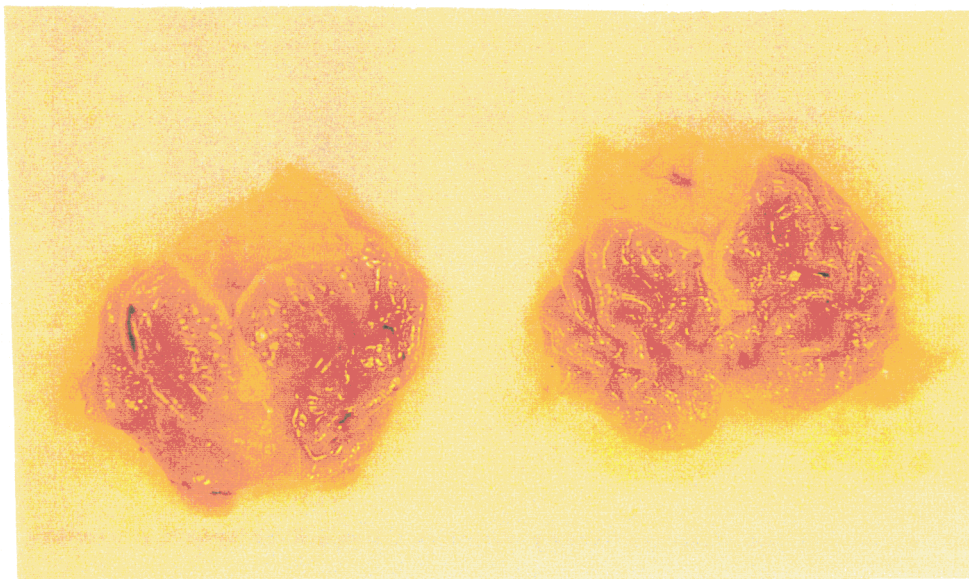
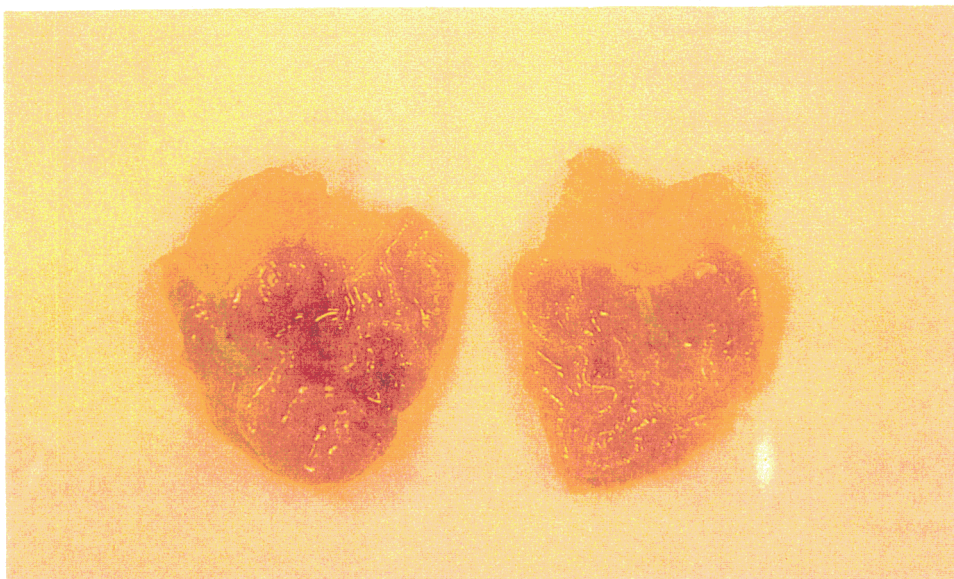


FIGURA 1. Porcentaje de inhibición de la ulceración de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii*.



Úlceras inducidas por Indometacina. A la derecha ,tratados por infusión de *S.m.magnolii*. A la izquierda, grupo control .



Úlceras inducidas por ligadura de píloro. A la derecha, tratados por infusión de *S.m. magnoli*. A la izquierda, grupo control.



Úlceras inducidas por Etanol. A la derecha, tratados por infusión de *S.m. magnoli*. A la izquierda, grupo control.

II.1.3.- EFECTO SOBRE LA SECRECIÓN GÁSTRICA

Los valores de pH del líquido de perfusión, son registrados cada cinco minutos durante un período de media hora. Los resultados obtenidos para cada tratamiento quedan reflejados en la Figura 2. El pH de la infusión a administrar resulta ser 5.3.

Los valores iniciales del contenido gástrico suponen un pH entre 6 y 7. La perfusión de suero fisiológico (pH=7) supone una acidificación del contenido gástrico, cuyo pH pasa del valor inicial entre 6 y 7 tras el lavado del sistema, a un valor de alrededor de 4.5.

La administración de una solución del mismo pH que la infusión (pH=5.3), no supuso cambios significativos con respecto a la administración de suero fisiológico.

Aproximadamente a la media hora de iniciar la perfusión con la infusión, se produce un considerable aumento del pH gástrico, alcanzándose valores de 5.3 a los 10 minutos, y cercano a 6 a los 30.

Al administrar tras la infusión de nuevo el suero fisiológico, a partir de los 15 primeros minutos, no se alcanzan valores tan ácidos como al comienzo del experimento.

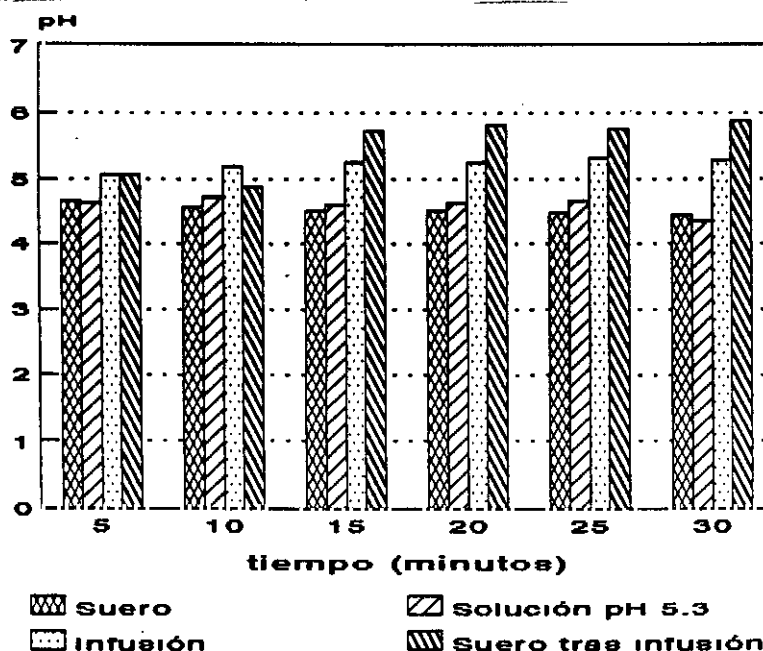


FIGURA 2. Efecto de la infusión de *S. m magnolii* sobre la secreción gástrica.

II.1.4.- EFECTO SOBRE EL TRÁNSITO INTESTINAL

El porcentaje de progresión de la papilla de carbón activo por el tracto intestinal de los lotes control, fué de alrededor del 80% a los 60 minutos de su administración oral (Figura 3).

En los lotes tratados con la sustancia de referencia, atropina, e infusión, la progresión de la papilla es sensiblemente inferior, aunque en ningún caso presenta valores estadísticamente significativos frente al grupo control. Esto supone un porcentaje de reducción del tránsito intestinal del 9% con la infusión, frente al 3% conseguido por la atropina.

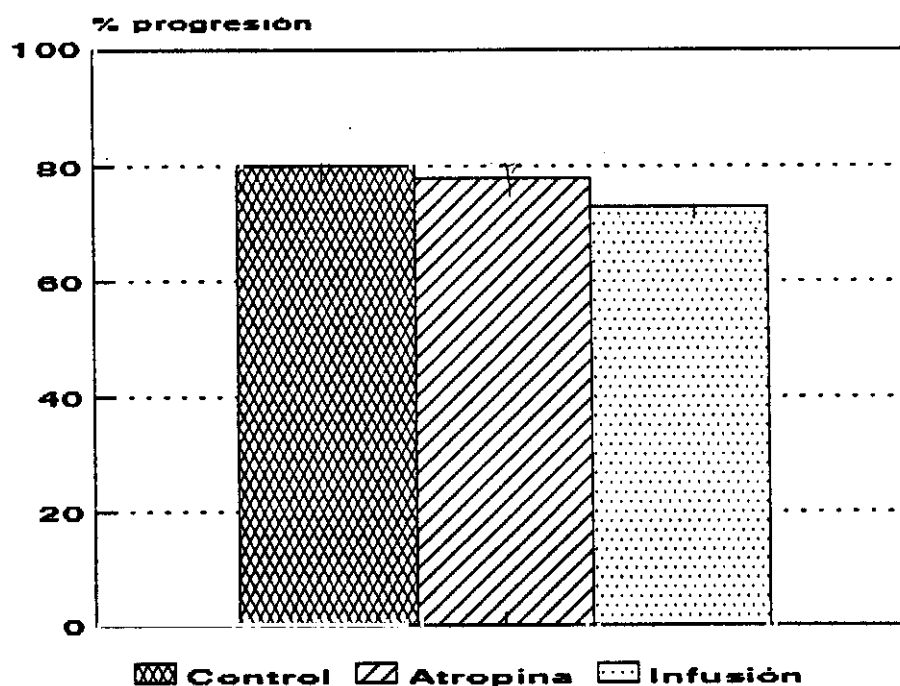


FIGURA 3. Efecto de la infusión de *S.m.magnolii* sobre el tránsito intestinal.

II.1.5.- EFECTO SOBRE CONSTANTES METABÓLICAS

Durante todo el periodo experimental (15 días), no se han observado manifestaciones macroscópicas de toxicidad en los animales de experimentación. Al final de la experiencia se practicó la autopsia a los animales de los diferentes lotes, no observándose afectación de sus órganos vitales.

En la Tabla 3 viene reflejado la evolución del peso corporal de los animales durante este periodo, así como la ingesta de comida, y el promedio del recuento diario del número de heces. Con respecto a la ingesta de agua y volumen de orina excretados, no se han encontrado diferencias significativas, entre el lote control y el lote tratado con la infusión.

Con respecto al peso corporal, los animales tratados con la infusión experimentan un aumento de aproximadamente el 7% con respecto al grupo control, aunque este aumento no es estadísticamente significativo. Asimismo, la ingesta de comida aumenta un 7.24% en los animales tratados con la infusión, mientras que el número de heces disminuye significativamente en un 12.89%.

TABLA 3. Efecto de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii* sobre constantes metabólicas.

Parametro	Control	Infusión
Incremento peso (g)	12.5±2.14	13.3±3.80 ^{NS}
Ingesta comida (g/rata)	17.9±0.40	19.2±0.75 ^{NS}
Recuento heces (nº/rata)	49.2±1.22	42.9±1.11 ^{**}

Los datos corresponden a la media aritmética±error estándar medio en lotes de 7 animales tratados durante un periodo de 15 días.

t-Student: NS, no significativo; ** $p \leq 0.01$

II.1.6.- ENSAYOS EN ÓRGANO AISLADO

La infusión de *S. minor magnolii* ha mostrado una marcada actividad espasmolítica frente a las contracciones inducidas por acetilcolina y cloruro bórico en duodeno de rata (Figuras 4 y 5).

La potencia de la infusión en relación con los antagonistas selectivos, atropina y papaverina, queda reflejada en la Figura 6.

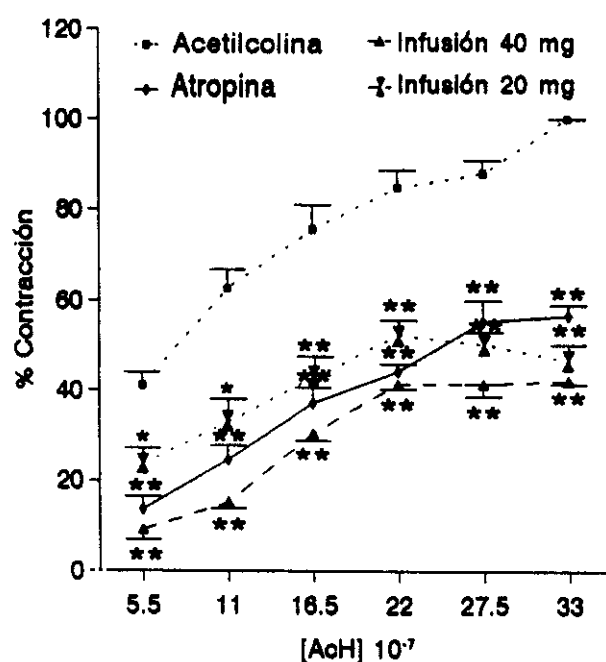


FIGURA 4. Efecto relajante de la infusión de *S.m.magnolii* sobre la contracción inducida por acetilcolina en duodeno aislado de rata Wistar (media aritmética \pm error estándar medio de 5 determinaciones).

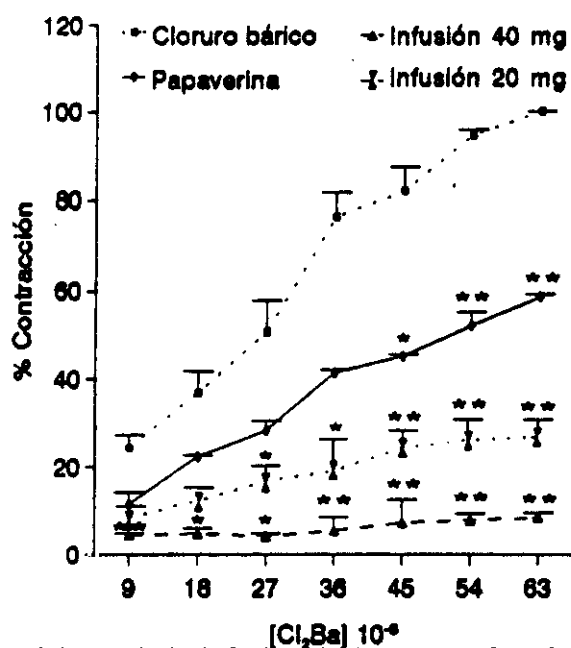


FIGURA 5. Efecto relajante de la infusión de *S.m.magnolii* sobre la contracción inducida por cloruro bórico en duodeno aislado de rata Wistar (media aritmética \pm error estándar medio de 5 determinaciones).

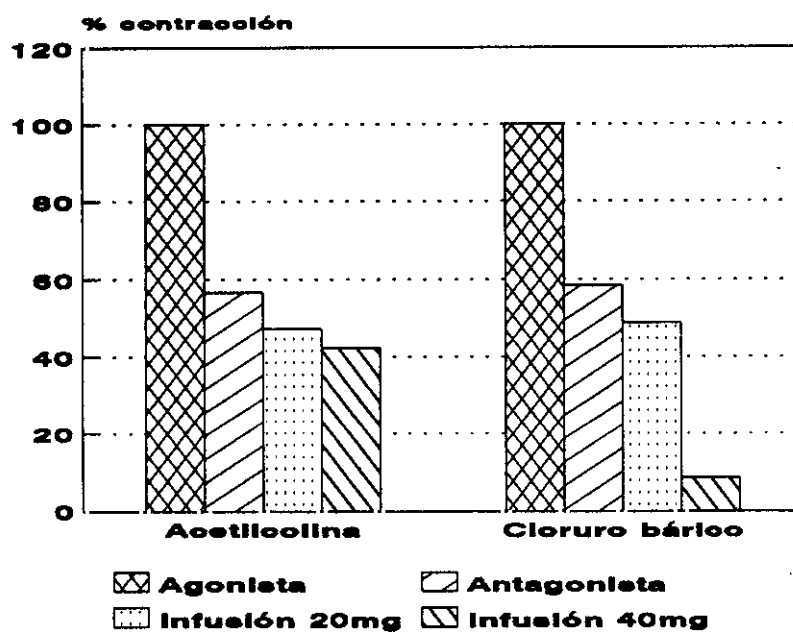


FIGURA 6. Actividad espasmolítica de la infusión de *S.m.magnolii* frente a la contracción inducida por acetilcolina y cloruro bórico. Porcentajes de máxima contracción.

II.2.- ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

La actividad hipoglucemiante se determina en ratones normales y en ratones, a los que previamente se les ha inducido una hiperglucemia experimental. En general, el efecto hipoglucemiante es más patente en este último reactivo animal.

La administración oral de la infusión de *S. minor magnolii*, supone una reducción de la glucemia en ratones normales e hiperglucémicos a partir de los 60 minutos de iniciar el tratamiento. Este efecto permanece estadísticamente significativo, hasta los 120 minutos posteriores (Tablas 4 y 5).

TABLA 4. Actividad hipoglucemiante de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii*. Incremento de glucosa en ratones Swiss normales.

Grupo	30'	60'	90'	120'
Control	19.8±2.31	24.8±5.70	29.8±4.10	25.8±5.34
Glibenclamida	18.1±2.29 ^{NS}	6.73±2.31 ^{**}	6.68±3.19 ^{**}	2.01±0.50 ^{**}
Infusión	22.3±3.29 ^{NS}	10.8±3.22 ^{**}	12.5±4.13 [*]	10.0±4.32 [*]

Los datos corresponden a la media aritmética±error estándar medio de las medidas de glucemia (mg/dl) en lotes de 7 animales, a los 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración del tratamiento. *t*-Student: NS, no significativo; ^{*}*p*≤0.05; ^{**}*p*≤0.01

TABLA 5. Actividad hipoglucemiante de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii*. Incremento de glucosa en ratones Swiss hiperglucémicos.

Grupo	30'	60'	90'	120'
Control	22.7±5.10	30.2±5.73	35.2±9.14	25.0±5.59
Glibenclamida	11.6±5.82 ^{NS}	5.50±3.66 [*]	5.66±5.46 ^{**}	0.00±0.00 ^{**}
Infusión	14.8±2.85 ^{NS}	3.66±2.53 ^{**}	0.00±0.00 ^{**}	2.50±2.50 [*]

Los datos corresponden a la media aritmética±error estándar medio de las medidas de glucemia (mg/dl) en lotes de 7 animales, a los 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración del tratamiento. *t*-Student: NS, no significativo; ^{*}*p*≤0.05; ^{**}*p*≤0.01

Sin embargo, la actividad hipoglucemiante de la infusión es mayor en ratones hiperglucémicos, con un porcentaje de reducción de la glucemia superior al de la sustancia de referencia, glibenclamida, durante todo el periodo experimental (Figuras 7 y 8).

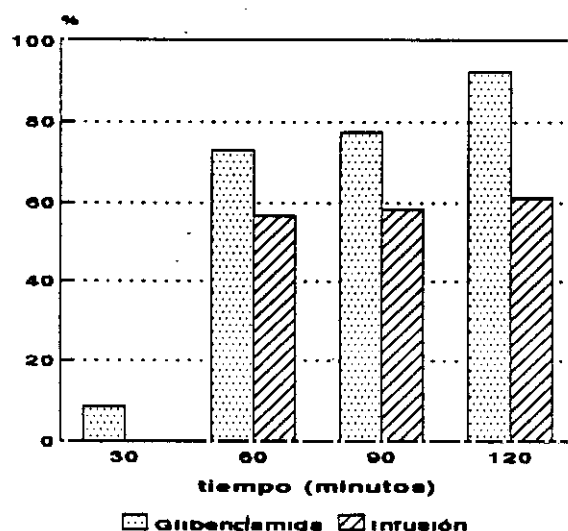


FIGURA 7. Porcentaje de reducción de la glucemia de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii*. Ratones Swiss normales.

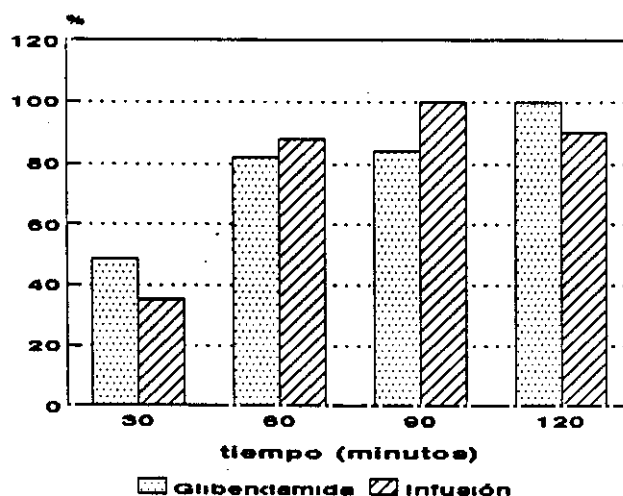


FIGURA 8. Porcentaje de reducción de la glucemia de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii*. Ratones Swiss hiperglucémicos.

III.- ESTUDIO FITOQUÍMICO

III.1.- SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Los ensayos fitoquímicos preliminares realizados con el material vegetal (hojas y tallos de *S. minor magnolii*), que constituyeron la Memoria de Tesina de Licenciatura (Rodríguez, 1984), indican la presencia de compuestos de tipo flavónico, saponinas, ácidos fenólicos, taninos, (mayoritariamente de tipo catéquico), así como azúcares reductores y mucílagos. No se detecta la presencia de antraquinonas, antocianos, heterósidos cianogénicos y sustancias alcaloídicas.

III.1.1.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Como **ácidos fenólicos libres** se habían identificado ácido vainílico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido gálico, siendo este último el mayoritario. En la fracción de **ácidos fenólicos combinados**, no se reconoce claramente la presencia de ninguna estructura de este tipo.

En la hidrólisis ácida, se han identificado ácido vainílico y ácido p-hidroxibenzoico. Los ácidos fenólicos que están en uniones éster, y liberados en la hidrólisis alcalina son ácido cafeico, ácido o- y p-cumárico y ácido vainílico.

III.1.2.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AZÚCARES

Los azúcares identificados por CCF en *S. minor magnolii* son: xilosa, fructosa, glucosa, así como trazas de galactosa y arabinosa. Asimismo, se han separado otros azúcares no identificados, cuyo comportamiento cromatográfico es diferente (valores de R_f más bajo), y que probablemente correspondan a moléculas de disacáridos.

Estos resultados son corroborados por los estudios en HPLC (Cromatogramas nº 1 y nº 2). Comparando los tiempos de retención con sustancias patrones, se identifican, además de los azúcares anteriormente citados, moléculas de sacarosa y maltosa, no detectadas en los estudios por CCF.

INJECT

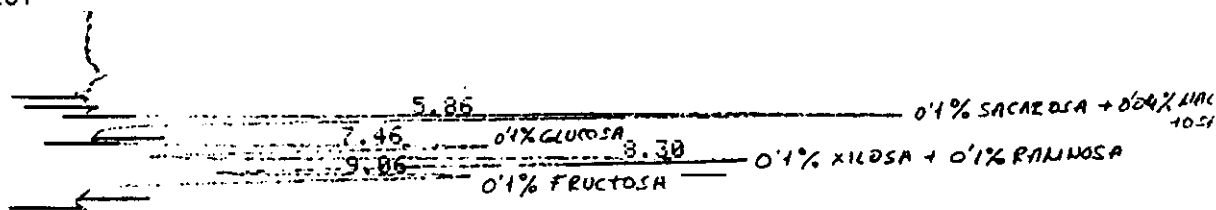


CHART 0.30 CM/MIN
 RUN
 COLUMN SOLVENT CALC #0
 OPR ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	129312.00000	5.86		129313705 L	0.000000E0
	93354.50000	7.46		93355155 F	0.000000E0
	196388.00000	8.30		196390603 F	0.000000E0
	98879.00000	9.06		98879661 L	0.000000E0
TOTAL	517934.00000				

INJECT

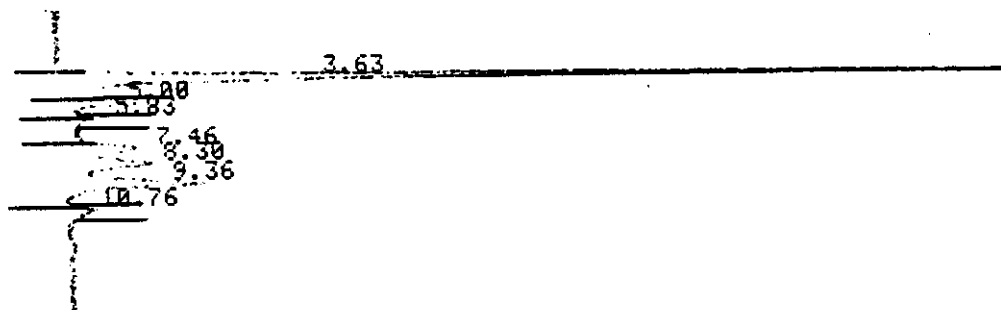


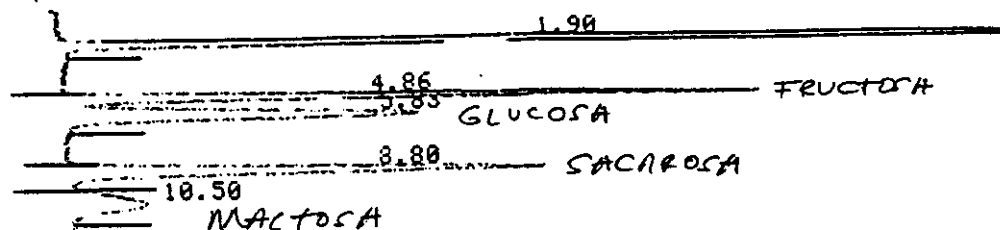
CHART 0.30 CM/MIN
 RUN
 COLUMN SOLVENT CALC #0
 OPR ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	150747.00000	3.63		150749080 L	0.000000E0
	8641.24000	5.00		8641.24 L	0.000000E0
	1984.80000	5.83		1984.80 L	0.000000E0
	18034.40000	7.46		18034548 F	0.000000E0
	22901.80000	8.30		22901896 F	0.000000E0
	33145.60000	9.36		33145855 L	0.000000E0
	5605.82000	10.76		5605850 L	0.000000E0
TOTAL	241061.00000				

Cromatograma n°1. Determinación de azúcares de *S.m.magnolii* por comparación con sustancias patrones. Columna Sugar Pack.

INJECT

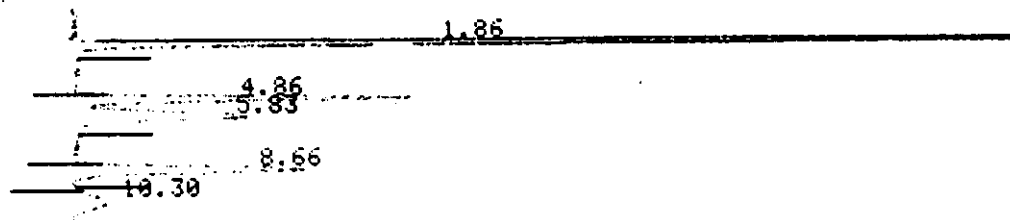


COLUMN CHART 0.30 CM/MIN
 RUN SOLVENT CALC #0
 OPR ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	276002.00000	1.90		276005400 EL	0.000000E0
	117978.00000	4.86		117979389 F	0.000000E0
	110139.00000	5.83		110140265 L	0.000000E0
	111934.00000	8.80		111935355 L	0.000000E0
	39897.90000	10.50		39898180 L	0.000000E0
TOTAL	655951.00000				

INJECT



COLUMN CHART 0.30 CM/MIN
 RUN SOLVENT CALC #0
 OPR ID: 7

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

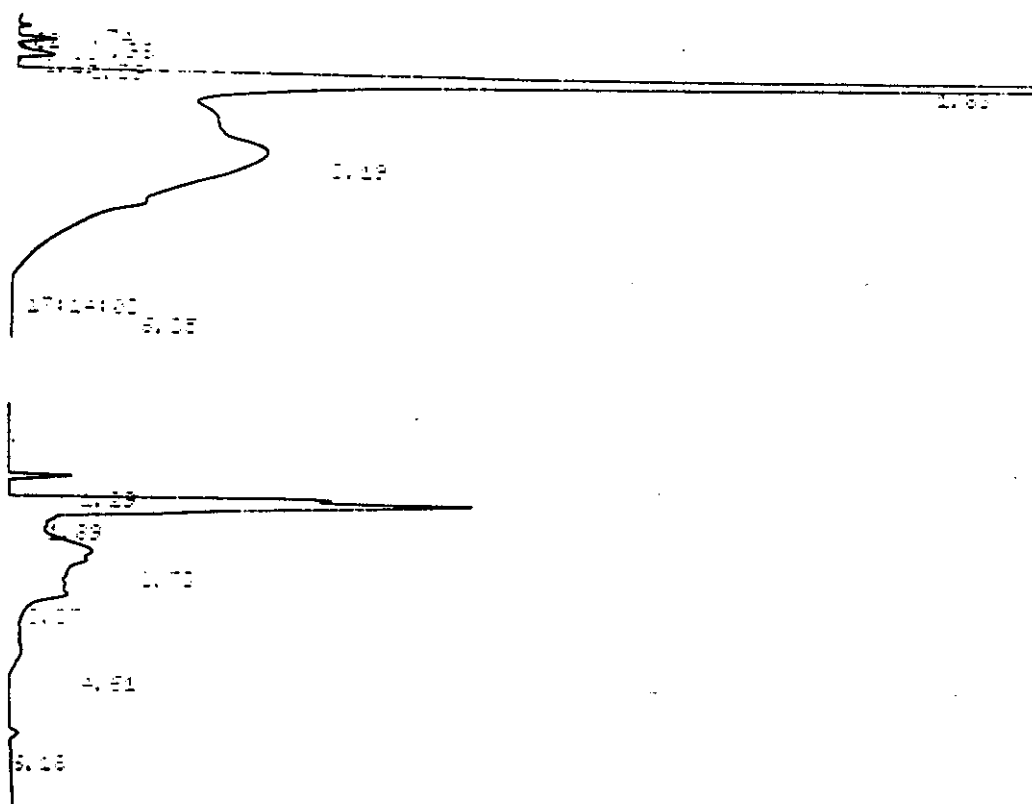
PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	215244.00000	1.86		215245795 EL	0.000000E0
	57308.20000	4.86		57308571 F	0.000000E0
	55451.60000	5.83		55451991 L	0.000000E0
	55905.80000	8.66		55906220 L	0.000000E0
	19465.00000	10.30		19465100 L	0.000000E0
TOTAL	403375.00000				

Cromatograma n°2. Determinación de azúcares de *S.m.magnolii* por comparación con sustancias patrones. Columna Lichrosorb 10-NH₂ Chrompack.

III.1.3.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE HETERÓSIDOS FLAVÓNICOS

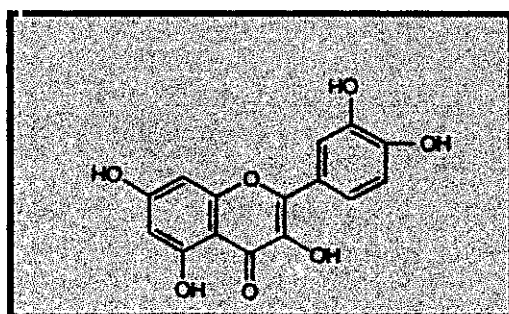
Del estudio por CCF de los compuestos flavónicos presentes en nuestra planta, se deduce la no existencia de geninas libres, presentándose al menos cinco moléculas heterosídicas.

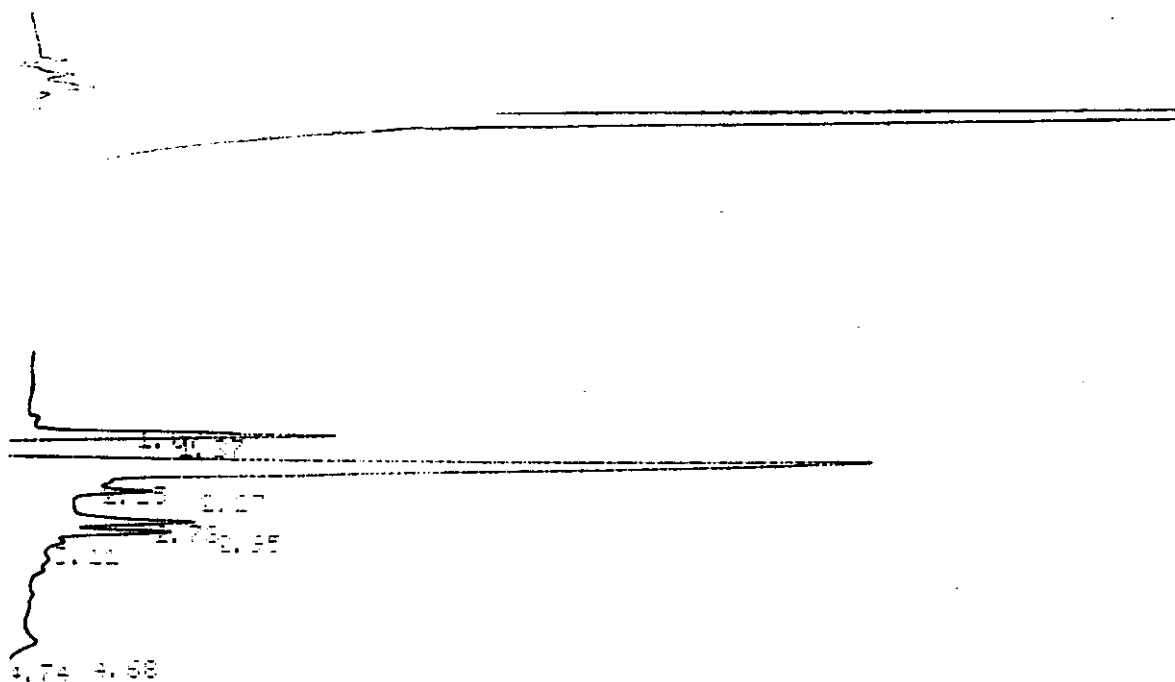
Por hidrólisis ácida en placa, y posterior estudio cromatográfico (CCF y HPLC), se identifican quercetol y kemferol (Cromatogramas nº 3 y nº 4), como geninas que forman parte de la estructura de los heterósidos. El estudio cromatográfico de la fracción glucídica, identifica como azúcares mayoritarios, glucosa y arabinosa.



Cromatograma n° 3. Identificación del quercetol en *S.m.magnolii* por comparación con sustancia patrón por HPLC.

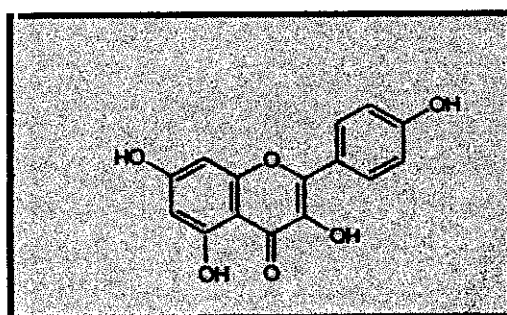
Estructura de la genina flavónica aislada e identificada de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii*: **quercetol**.





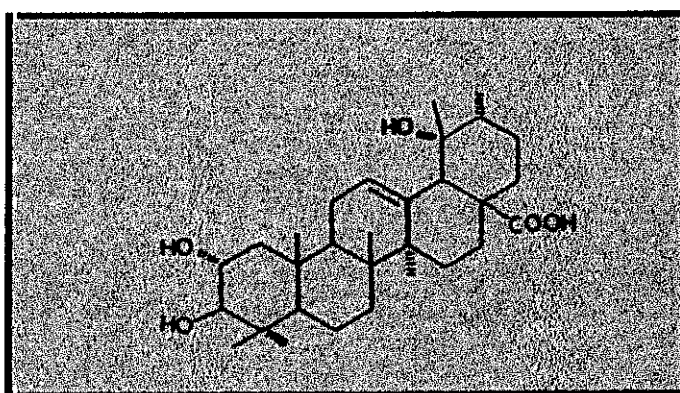
Cromatograma n° 4. Identificación del kemferol en *S.m.magnolii* por comparación con sustancia patrón por HPLC.

Estructura de la genina flavónica aislada e identificada de la infusión de *Sanguisorba minor magnolii*: **kemferol**.



III.1.4.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE HETERÓSIDOS SAPONÍNICOS

Por estudios cromatográficos en capa fina, con la ayuda de sustancias patrones de referencia, se identifica **ácido torméntico**, como molécula de naturaleza tipo saponina, mayoritaria en nuestra especie.

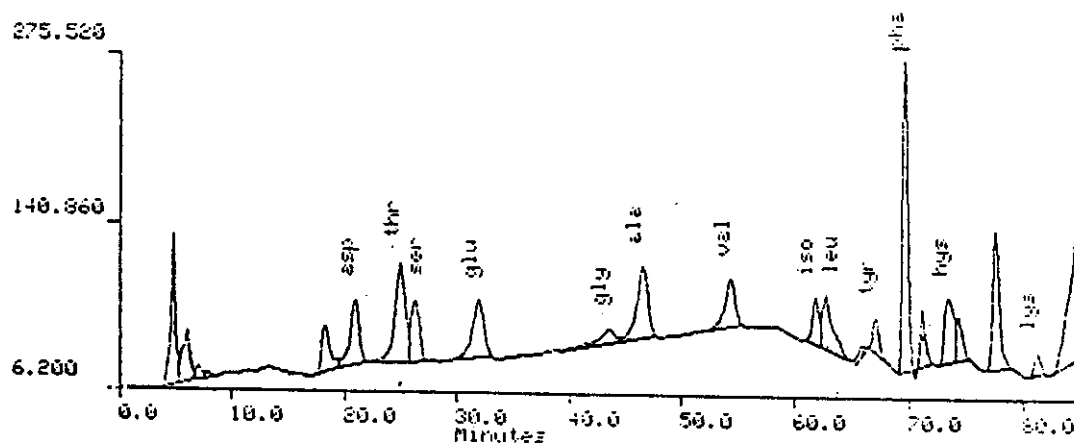


Este compuesto, a su vez, ha sido previamente identificado dentro del género *Sanguisorba*, y géneros botánicamente próximos (Potier *et al.*, 1966; Villar *et al.*, 1986; Ivorra *et al.*, 1988; Stachurski *et al.*, 1995).

III.1.5.- INVESTIGACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos identificados en *S. minor magnolii* por HPLC (Cromatograma nº 5), así como la proporción en la que se encuentran presentes en la planta, vienen reflejados en la Tabla 6.

Se han identificado igualmente, trazas de prolina, cistina, metionina y tirosina. También existe arginina, que no pudo ser cuantificada al coeluir con el amoníaco, y trazas de ácido gamma-aminobutírico.



Cromatograma nº 5. Determinación de aminoácidos de *S.m.magnolii* por HPLC.

TABLA 6. Análisis cuali y cuantitativo por HPLC de los aminoácidos en *Sanguisorba minor magnolii*.

Aminoácido	Concentración (mg/100 ml)
Glutámico	2.27
Aspártico	2.09
Alanina	1.78
Treonina	1.72
Fenilalanina	1.31
Leucina	1.28
Valina	1.05
Serina	1.04
Lisina	0.99
Histidina	0.61
Isoleucina	0.45
Glicina	0.29

III.1.6.- ACEITE ESENCIAL

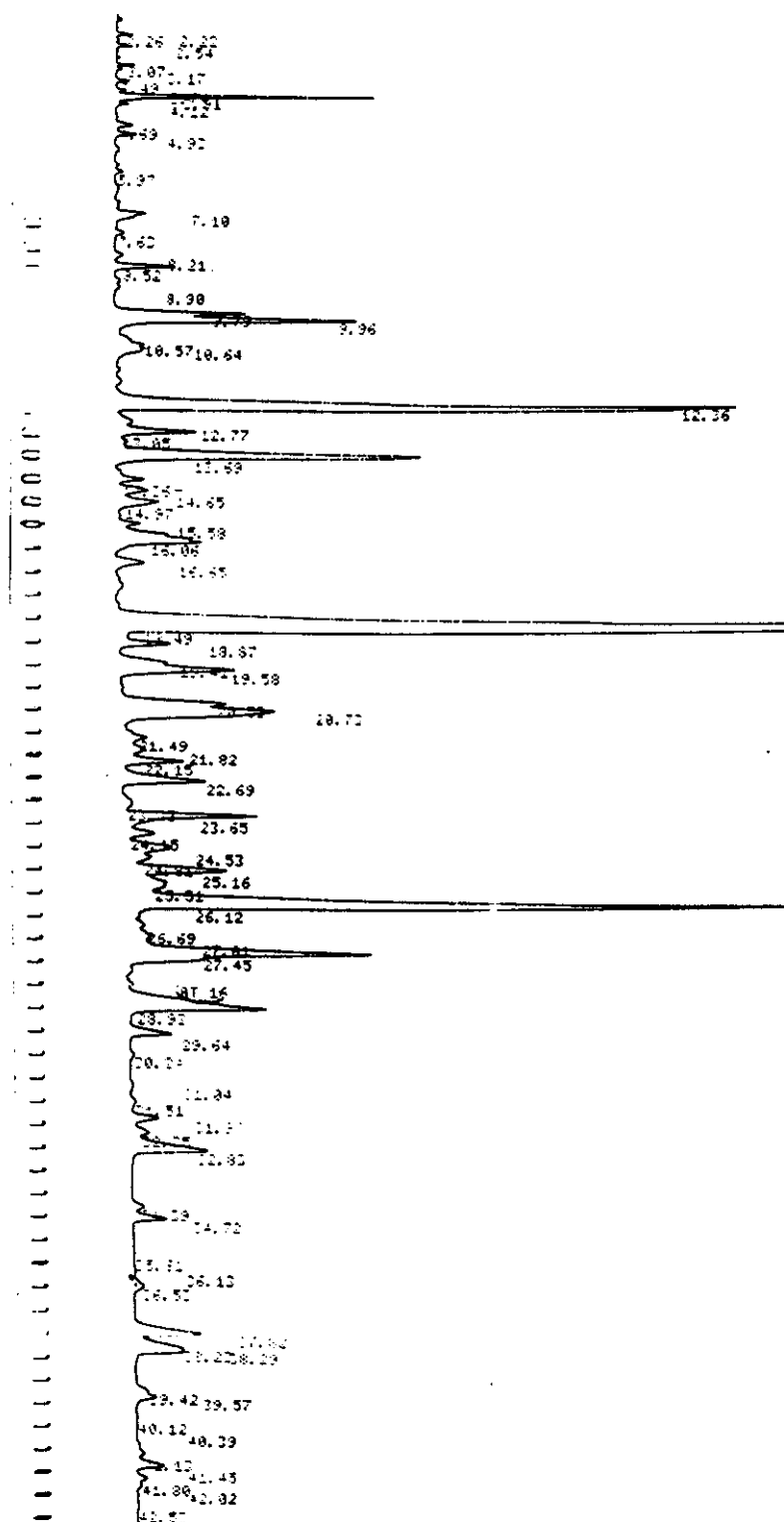
Las características organolépticas de la esencia obtenida de *S. minor magnolii*, corresponden con un aceite muy viscoso, transparente, de color amarillo-ámbar, y olor fuerte y penetrante. El rendimiento obtenido fué de 0.035%

El análisis cualitativo del aceite esencial por cromatografía de gases, da una idea de la complejidad en cuanto a composición de la muestra a estudiar. En el Cromatograma nº 3, quedan reflejados los picos obtenidos en este análisis.

Comparando los valores de retención relativa, con los aportados por la bibliografía, únicamente se pueden identificar como probables constituyentes de la esencia, los compuestos reflejados en la Tabla 7, quedando para estudios posteriores el análisis más concreto del aceite esencial.

TABLA 7. Composición cualitativa del aceite esencial de *Sanguisorba minor magnolii*.

Constituyente	t _R
Alcohol butílico	3.51
Mirceno	8.55
α -terpineno	12.36
Yomogi alcohol	13.69
Alcanfor	14.36
Isomentona	20.93
Borneol	26.12



III.2.- AISLAMIENTO DE COMPUESTOS

III.2.1.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Este tipo de cromatografía ha servido para tener una primera idea orientativa de la complejidad de la infusión de *S. minor magnolii*.

De la observación de los cromatofolios, utilizando diferentes fases móviles y distintos reveladores, se deduce la enorme complejidad de la infusión, con una presencia mayoritaria de compuestos polifenólicos, muy probablemente flavonoides, y estructuras de tipo saponinas en forma heterosídica.

Dada la enorme complejidad en cuanto a composición de los extractos acuosos, se planteó realizar una purificación previa al fraccionamiento por CC. Para ello, una vez obtenida la infusión, el marco es extraído de nuevo con etanol, con objeto de obtener una fracción saponínica más pura.

Los ensayos en CCF realizados con la infusión y extracto etanólico, demostraron que ambos no difieren esencialmente en cuanto a composición, aunque en el extracto etanólico, libre de muchas impurezas arrastradas en la infusión, la complejidad es mucho menor, por lo que se decidió continuar el proceso de fraccionamiento con este extracto.

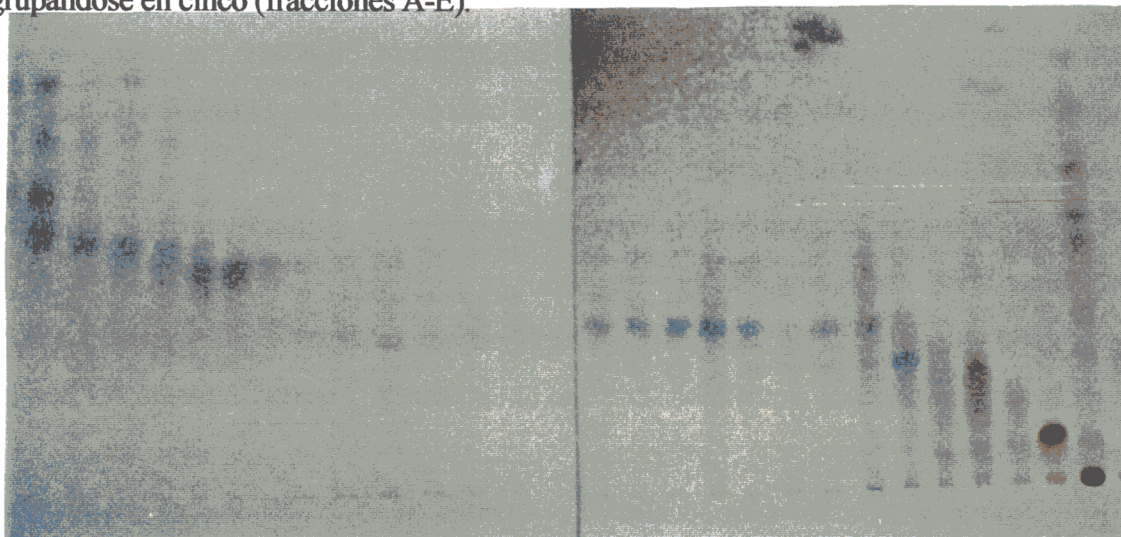
III.2.2.- CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Dentro de los solventes ensayados en CCF, los mejores resultados se han obtenido con mezclas progresivas de hexano/acetona, comenzando con la proporción 80:20. Así se logra separar aceptablemente las impurezas del resto de la muestra, siendo ésta la fase móvil utilizada en la CC.

Se fraccionan 40 g de extracto etanólico de *S. minor magnolii* en "flash" cromatografía. La relación peso muestra a peso adsorbente idónea para la separación es de 1:40. Las fracciones, de aproximadamente 50 ml, son recogidas en tubos de ensayo, y concentradas a presión reducida y temperatura controlada en rotavapor (Bucchi).

El seguimiento de la separación cromatográfica del extracto se realiza por CCF de silicagel (GF254), utilizando diferentes solventes y reveladores.

Las fracciones con un comportamiento cromatográfico similar son reunidas, agrupándose en cinco (fracciones A-E).



Fraccionamiento por cromatografía en columna (hexano-acetona 80-20/50-50) de un extracto etanólico de *S.m.magnolii*.

En las fracciones B y E cristalizan espontáneamente dos compuestos puros (compuestos 1 y 2), que tras filtración son recogidos y sometidos a técnicas espectroscópicas, para intentar dilucidar su estructura molecular.

III.3.- ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS

Para la elucidación estructural de los compuestos aislados de *S. minor magnolii*, se emplean las técnicas espectroscópicas más ampliamente utilizadas para este fin: la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), tanto de protón (^1H -RMN) como de carbono (^{13}C -RMN), y la espectroscopía infrarroja (IR).

A la vista de los resultados obtenidos con estas técnicas, relacionándolos con los datos aportados por la bibliografía, se establece una posible estructura molecular.

III.3.1.- IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 1

El espectro de IR indica la presencia de doble enlace $\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$ (señal a 1670 cm^{-1}) así como de grupos hidroxilo R_2CHOH (señal a 3400 cm^{-1}).

Para la identificación estructural del compuesto 1, nos hemos basado fundamentalmente en los datos obtenidos con el espectro de ^{13}C -RMN. Las señales de este espectro son las esperadas para un triterpeno. Se trata de un producto interesante, con una alta probabilidad de ser una nueva sustancia.

A la espera de realizar técnicas espectroscópicas complementarias, se puede establecer tres hipótesis acerca de su estructura.

Por antecedentes bibliográficos, y a tenor de una señal débil que aparece a 179.89 ppm, hemos considerado la posibilidad de que el compuesto 1 sea un derivado del tipo del ácido ursólico.

Sin embargo, existen dos señales en el espectro de ^{13}C -RMN, que no nos permiten asignar definitivamente esta estructura para el compuesto 1. Por un lado, el desplazamiento químico del carbono en posición 1' debería aparecer aproximadamente a 95.2 ppm, mientras que en nuestro espectro aparece una señal a 102.4 ppm. Por otro lado, tenemos una señal a 66.10 ppm, que no corresponde al carbono en 6' (que debería aparecer a 62.5 ppm), porque además es de un carbono trisustituido.

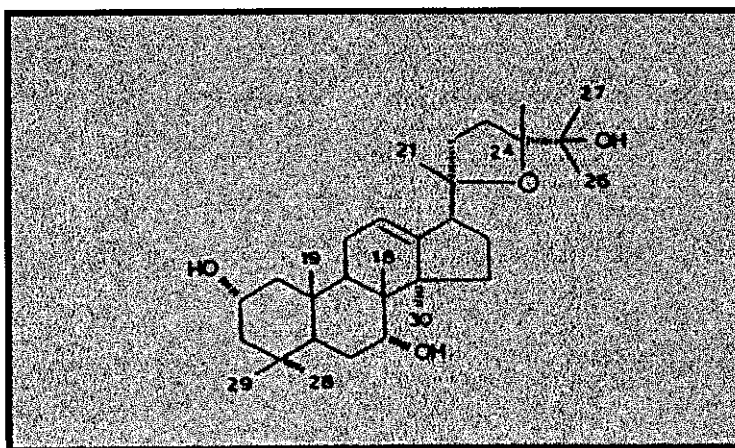
En el espectro de ^1H -RMN, comparándole con el propuesto para el ácido ursólico (Tori *et al.*, 1975; Seo *et al.*, 1975; Lee *et al.*, 1988), únicamente concuerdan los singletes

centrados a 1.04, 0.85 y 0.77 ppm, correspondientes a los protones en posición 27, 26 y 24, respectivamente. Asimismo, aparece un doblete a 0.83 ppm ($J = 6.2$ Hz), asignable al protón en posición 29.

Una segunda hipótesis, nos hace pensar que el compuesto 1 es un glicósido triterpénico del tipo a-amirina. Sin embargo, y en lo referente al azúcar, se presentan los mismos problemas espectrales que en el caso anterior. Además, en el espectro de ^{13}C -RMN no se detecta señal alguna en el entorno de 59.19 ppm, asignada al carbono en posición 18 de la a-amirina. No se explica tampoco la señal que aparece a 179.89 ppm.

La tercera hipótesis, y la más consistente acerca de la estructura del compuesto 1, nos conduce a un triterpeno del tipo epoxi-dammarano. En este supuesto, se admite que el compuesto 1 no es un glicósido, sino un triterpeno polioxigenado. La señal que aparece a 179.89 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN, pertenece a una impureza.

Comparando con modelos de dammaranos y de amirina para el anillo C (Francisco *et al.*, 1984; Tori *et al.*, 1988), se puede llegar tentativamente a la siguiente estructura para el compuesto 1.

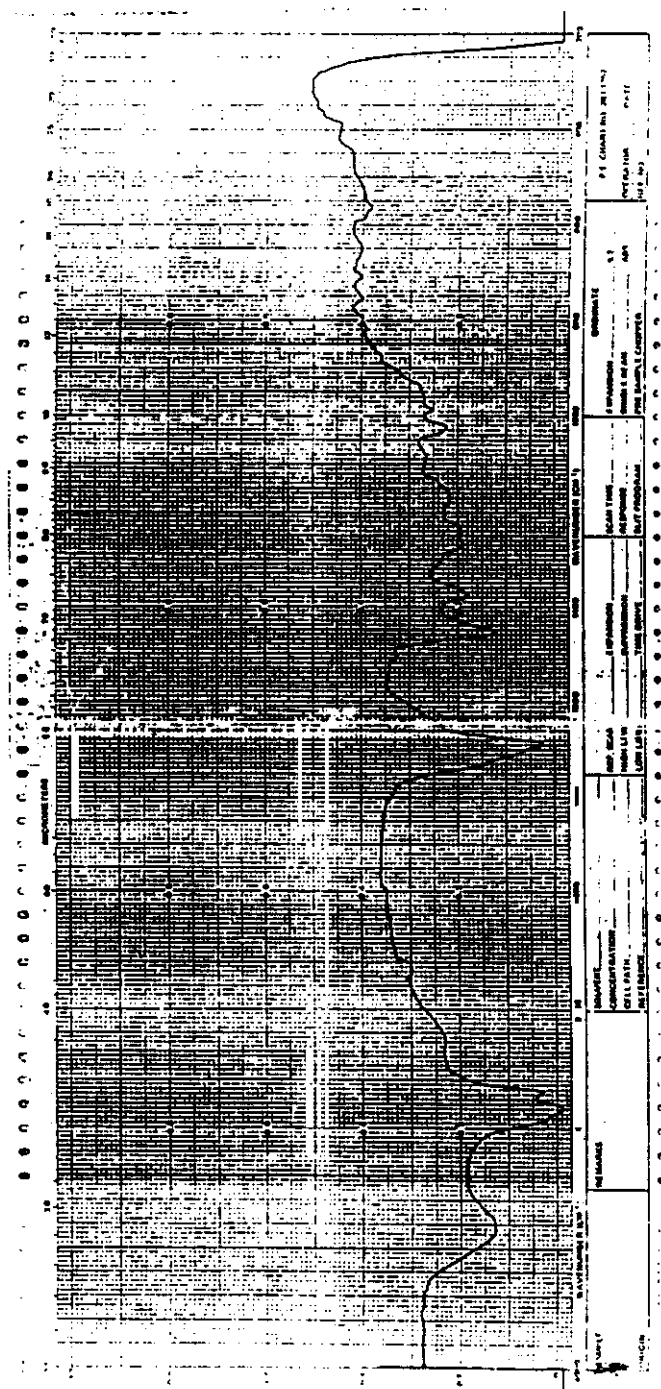


Las señales del espectro de ^{13}C -RMN para esta molécula, vienen reflejadas en la Tabla 8. No obstante, la señal del carbono en posición 1 es demasiado intensa, mientras que los desplazamientos químicos del C-7, C-20, C-23 y C-24, presentan una intensidad por debajo de lo normal.

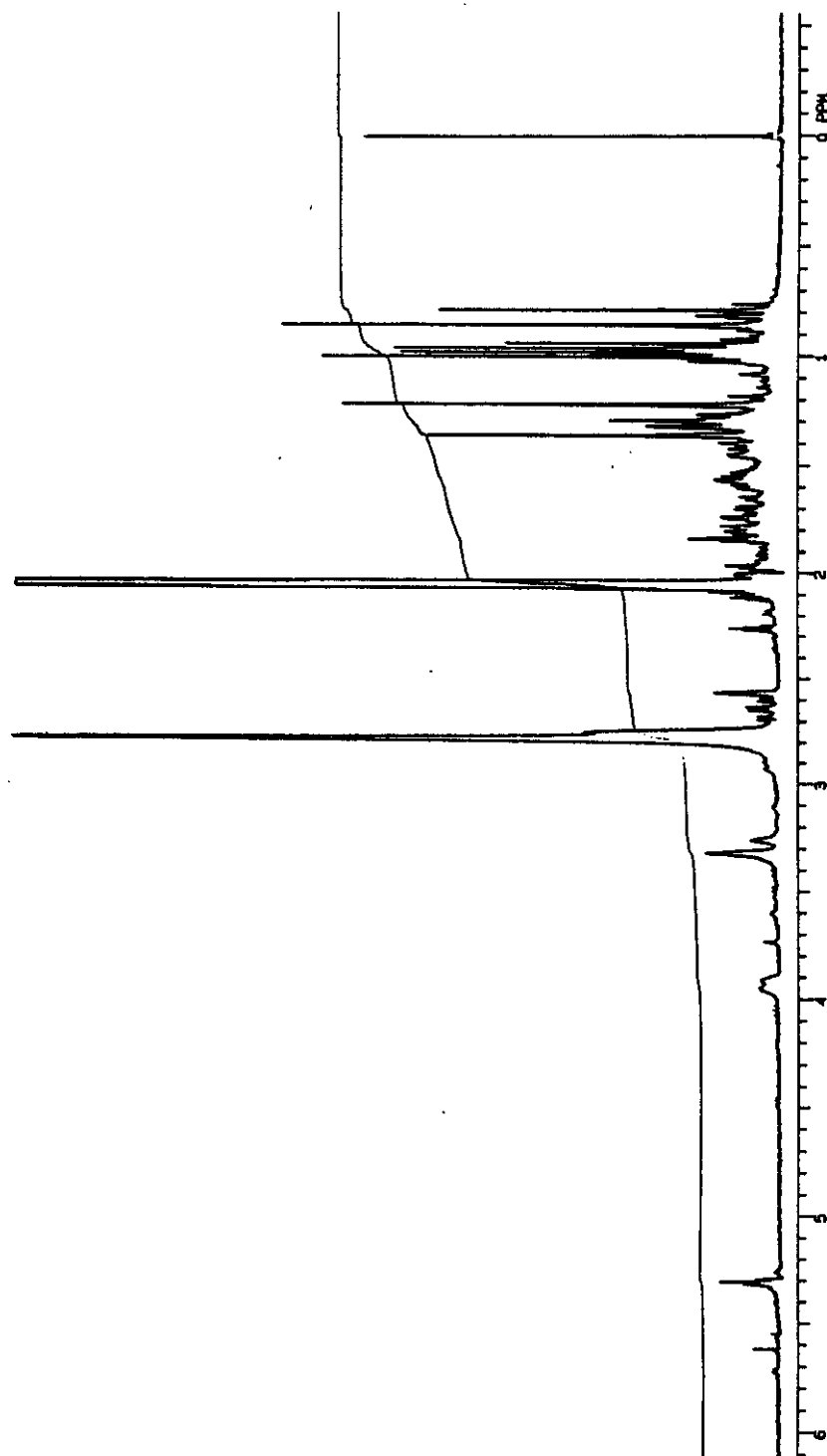
La complejidad estructural del compuesto 1, y el hecho de que las otras técnicas espectrales no confirmen definitivamente las hipótesis establecidas por el espectro de ^{13}C -RMN, hace necesario la realización de otras técnicas complementarias y más complejas, que permitan asignar con toda probabilidad esta estructura molecular.

TABLA 8. ^{13}C -RMN (50 Mhz, CDCl_3). Desplazamientos químicos para el compuesto 1.

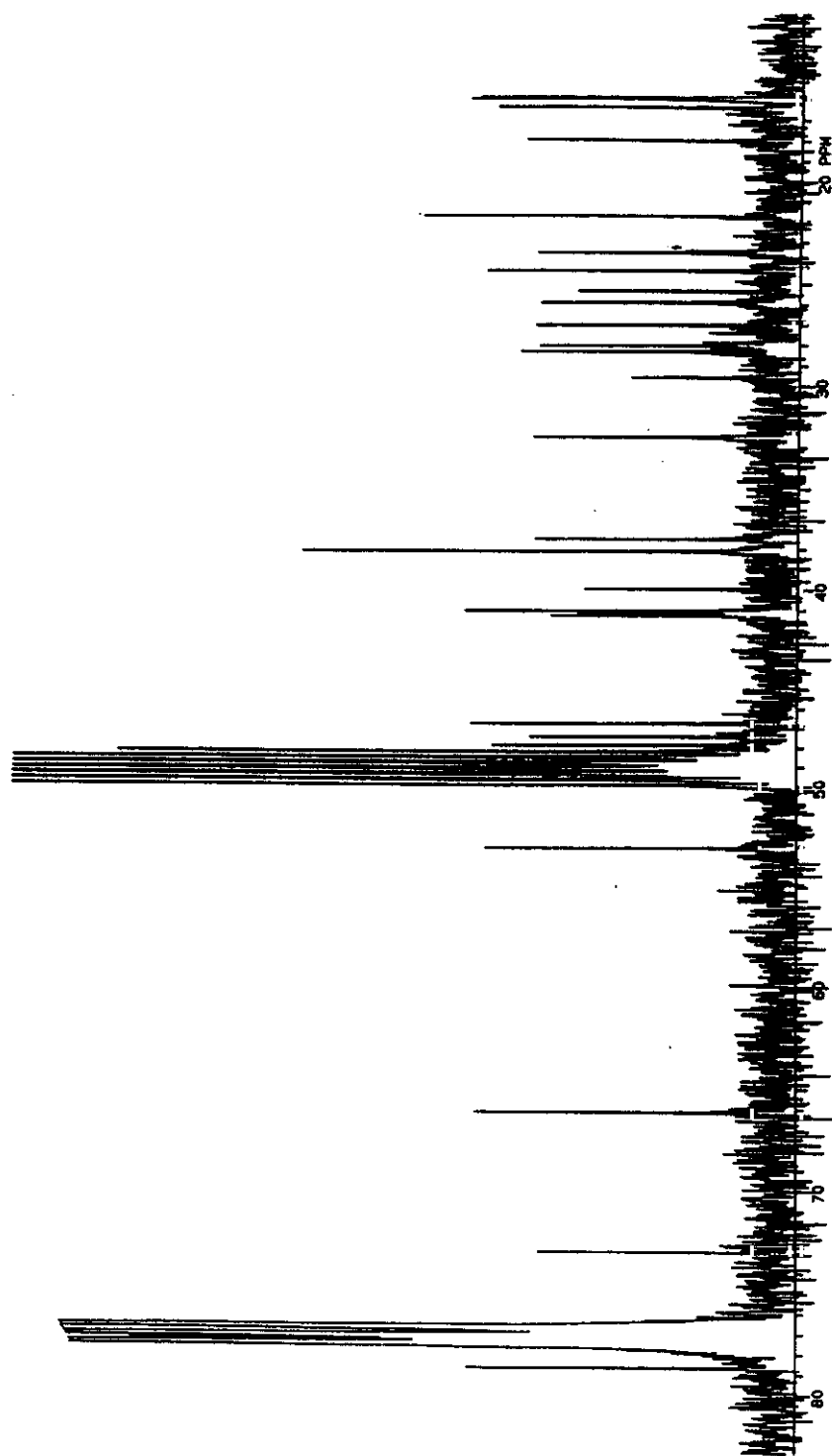
Carbono	Desplazamiento químico (ppm)
1	49.87
2	66.09
3	53.02
4	39.92
5	47.83
6	25.86
7	76.23
8	41.25
9	47.39
10	37.44
11	23.47
12	128.78
13	138.6
14	41.15
15	32.04
16	28.00
17	48.16
18	16.40
19	15.94
20	102.43
21	26.98
22	38.05
23	29.54
24	77.72
25	72.89
26	24.34
27	28.28
28	41.10
29	21.68
30	16.05



Espectro de IR correspondiente al compuesto 1.



Espectro de ^1H -RMN correspondiente al compuesto 1.

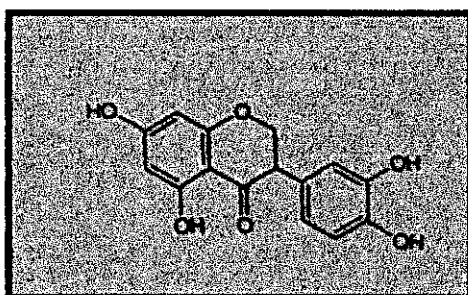


Espectro de ^{13}C -RMN correspondiente al compuesto 1.

III.3.2.- IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 2

Los resultados del espectro de RMN, tanto de protón como de carbono, del compuesto 2, obtenidos por comparación de los desplazamientos químicos respecto al TMS como patrón interno, concuerdan con una naturaleza de isoflavanona.

Estos resultados, junto con los datos aportados por la bibliografía (Farkas *et al.*, 1971; Filho *et al.*, 1973), permiten establecer como estructura probable para el compuesto 2 la de una 5,7,3',4'-tetrahidroxiisoflavanona.

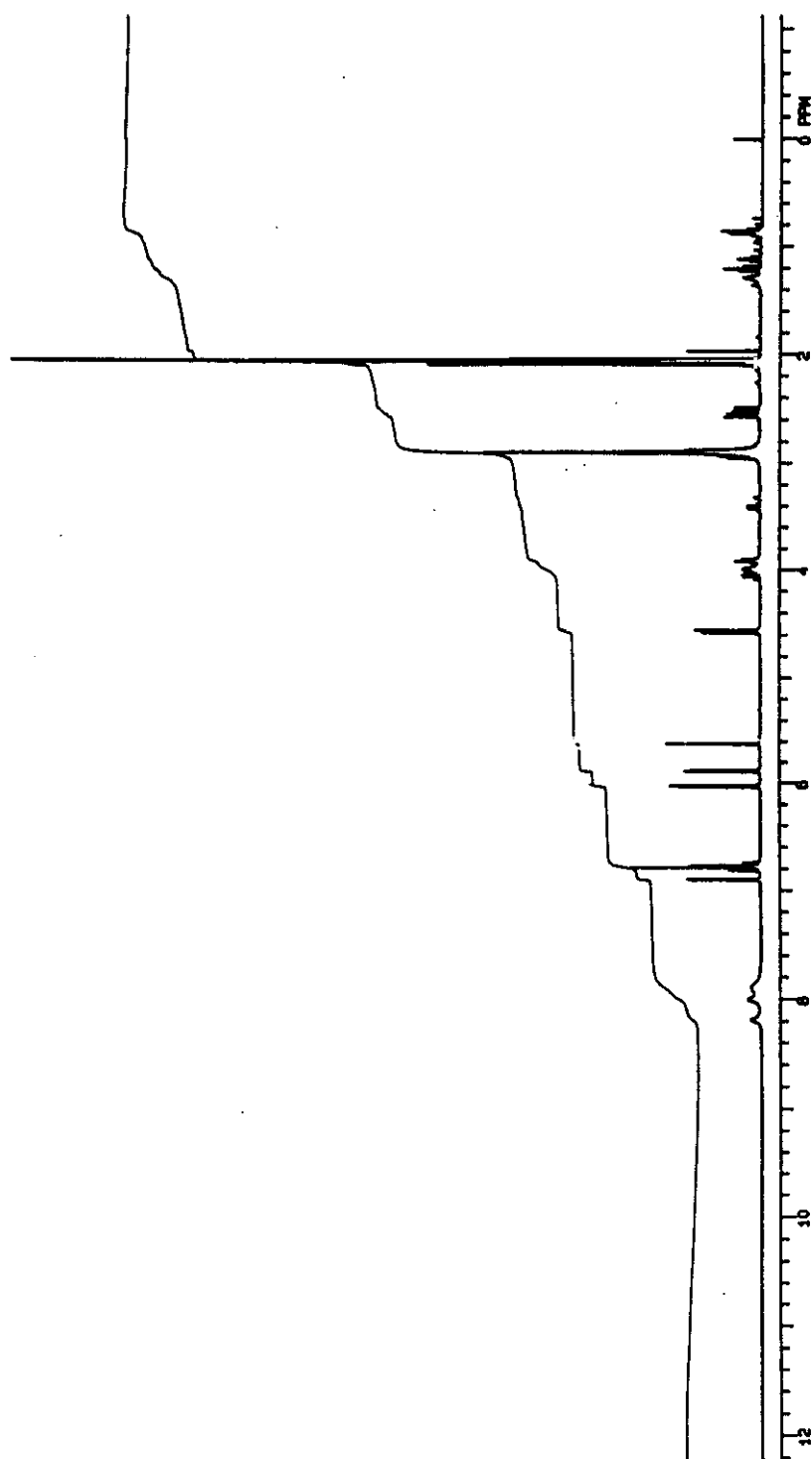


No obstante, existen problemas en el espectro de ^1H -RMN con la interpretación de las señales asignadas a los protones en 2 y 3. De acuerdo con las referencias bibliográficas para espectros de isoflavanonas, los desplazamientos químicos a 4.6 y 4.0 ppm corresponden a los protones en posición 2 y 3 respectivamente, mientras que en nuestro caso, las señales se dan a la inversa.

Sin embargo, el resto de las señales del espectro concuerdan con la estructura molecular propuesta. Se observan dos dobletes centrados a 6.80 y 6.89 ppm ($J = 2.0$ Hz y 8.0 Hz, respectivamente), correspondientes a los protones en posición 2' y 6' de la estructura isoflavanónica. Asimismo, aparecen nuevos dobletes a 5.87 y 6.02 ppm ($J = 2.3$ Hz), asignables a los protones 6 y 8 del anillo A. A su vez, el protón situado en el carbono 5' del anillo B, exhibe una señal a 6.75 ppm ($J = 2.0$ Hz y 8.0 Hz).

En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **2**, relacionándolo con los datos aportados por la bibliografía (Markham & Chari, 1982), se observan dos señales a 71.7 y 50.9 ppm de los carbonos en posición 2 y 3 del anillo A, típicos de estructuras tipo isoflavanonas.

Tras el estudio conjunto de todos los datos espectrales, relacionándolos con los aportados por la bibliografía, podemos establecer como muy probable esta estructura para el compuesto **2**.



Espectro de ^1H -RMN correspondiente al compuesto 2.

IV.- ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE COMPUESTOS AISLADOS

IV.1.- ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

A la vista de los resultados obtenidos con la infusión, los ensayos de hipoglucemia se realizan sólo con ratones a los que previamente se les ha inducido una hiperglucemia experimental.

La administración oral de los compuestos aislados de *S. minor magnolii* supone una reducción de la glucemia, que es más patente con el compuesto 1, y estadísticamente significativa hasta los 90 minutos de su aplicación. En ningún caso, este efecto perdura hasta el final del periodo experimental (Tabla 9).

TABLA 9. Actividad hipoglucemiante de los compuestos aislados de *Sanguisorba minor magnolii*. Incremento de glucosa en ratones Swiss hiperglucémicos..

Grupo	30'	60'	90'	120'
Control	22.7±5.10	30.2±5.73	35.2±9.14	25.0±5.59
Glibenclamida	11.6±5.82 ^{NS}	5.50±3.66*	5.66±5.46**	0.00±0.00**
Compuesto 1	41.8±3.80 ^{NS}	18.5±4.50*	17.6±6.24*	21.8±8.84 ^{NS}
Compuesto 2	24.0±8.05 ^{NS}	30.1±4.62 ^{NS}	19.8±5.52*	18.8±6.55 ^{NS}

Los datos corresponden a la media aritmética±error estándar medio de las medidas de glucemia (mg/dl) en lotes de 7 animales, a los 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración del tratamiento.

t-Student: NS, no significativo; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

El porcentaje de reducción de la glucemia alcanza valores de alrededor del 50%, a los 90 minutos de iniciar el tratamiento con ambos compuestos (Figura 9).

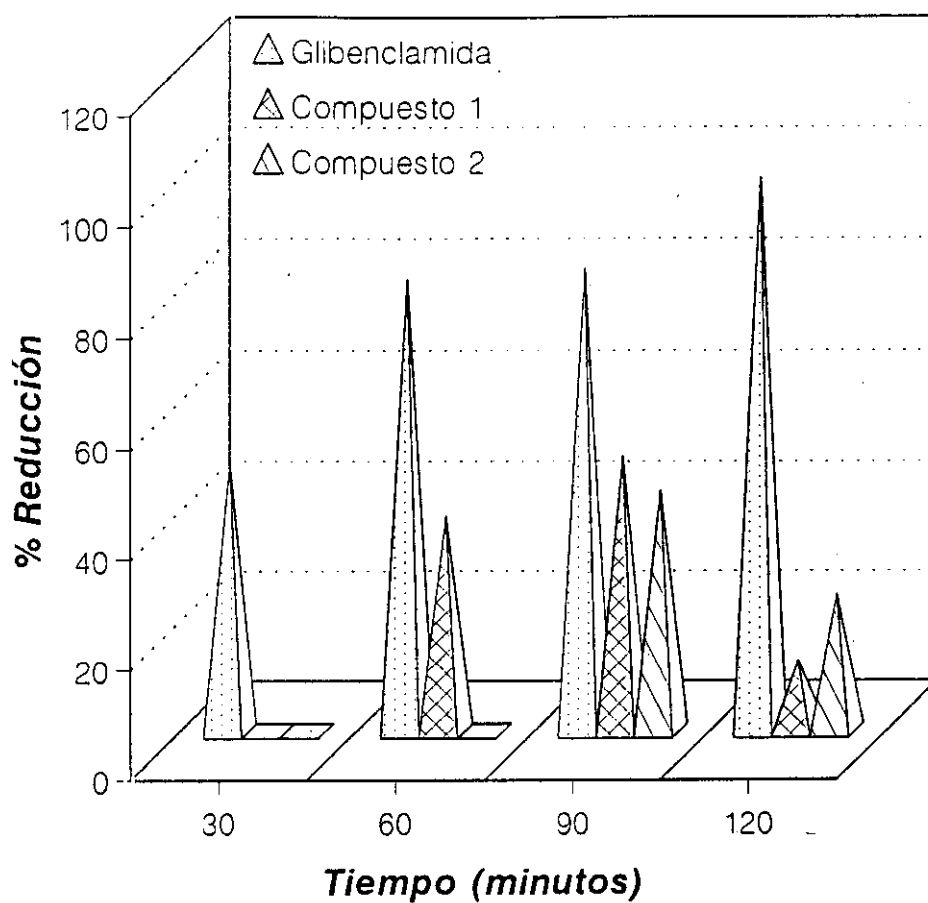


FIGURA 9. Porcentaje de reducción de la glucemia de los compuestos aislados de *Sanguisorba minor magnolii*. Ratones Swiss hiperglucémicos.

V.2.- ENSAYOS EN ÓRGANO AISLADO

Los compuestos aislados de *S. minor magnolii* se han mostrado como potentes agentes espasmolíticos, inhibiendo casi por completo las contracciones inducidas por acetilcolina y cloruro bórico (Figuras 10,11,12 y 13). En general, este efecto es más patente con el compuesto 1, aunque en ambos casos los resultados son estadísticamente significativos.

La potencia de ambas moléculas en relación con los antagonistas selectivos, atropina y papaverina, queda reflejada en la Figuras 14 y 15..

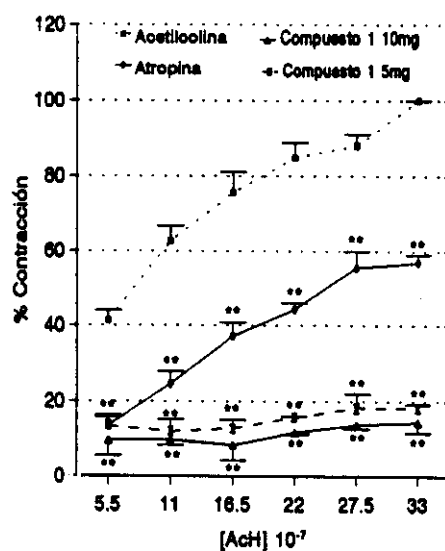


FIGURA 10. Efecto relajante del compuesto 1 aislado de *S.m.magnolii* sobre la contracción inducida por acetilcolina en duodeno aislado de rata Wistar (media aritmética \pm error estándar medio de 5 determinaciones).

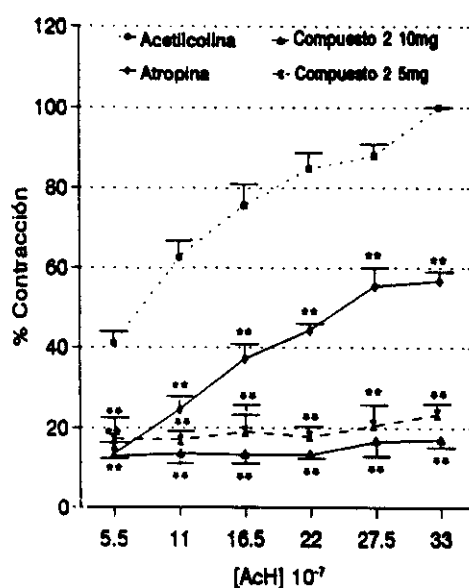


FIGURA 11. Efecto relajante del compuesto 2 aislado de *S.m.magnolii* sobre la contracción inducida por acetilcolina en duodeno aislado de rata Wistar (media aritmética \pm error estándar medio de 5 determinaciones).

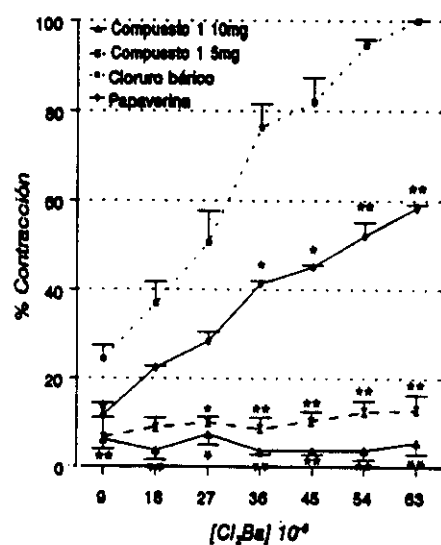


FIGURA 12. Efecto relajante del compuesto 1 aislado de *S.m.magnolii* sobre la contracción inducida por cloruro bórico en duodeno aislado de rata Wistar (media aritmética \pm error estándar medio de 5 determinaciones).

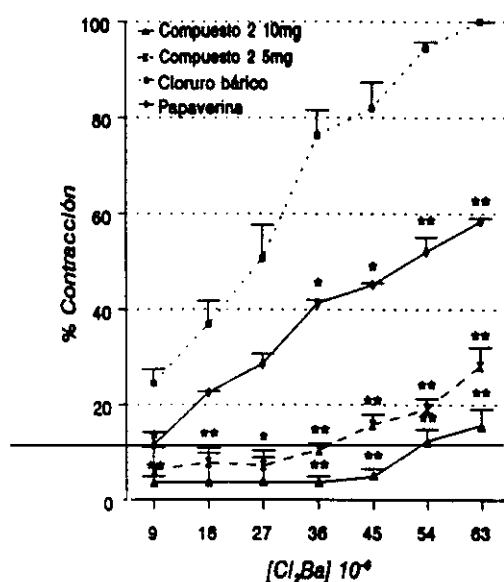


FIGURA 13. Efecto relajante del compuesto 2 aislado de *S.m.magnolii* sobre la contracción inducida por cloruro bórico en duodeno aislado de rata Wistar (media aritmética \pm error estándar medio de 5 determinaciones).

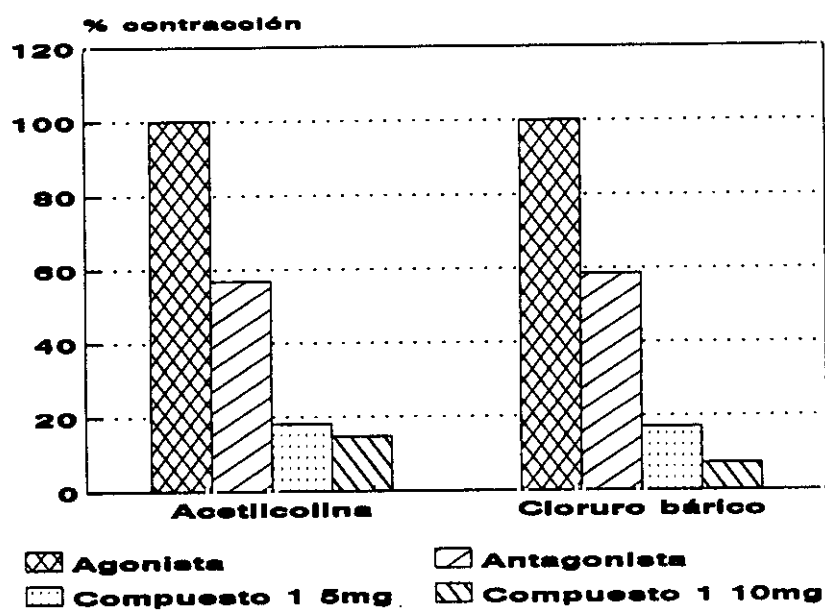


FIGURA 14. Actividad espasmolítica del compuesto 1 aislado de *S.m.magnolii* frente a la contracción inducida por acetilcolina y cloruro bórico.

Porcentajes de máxima concentración.

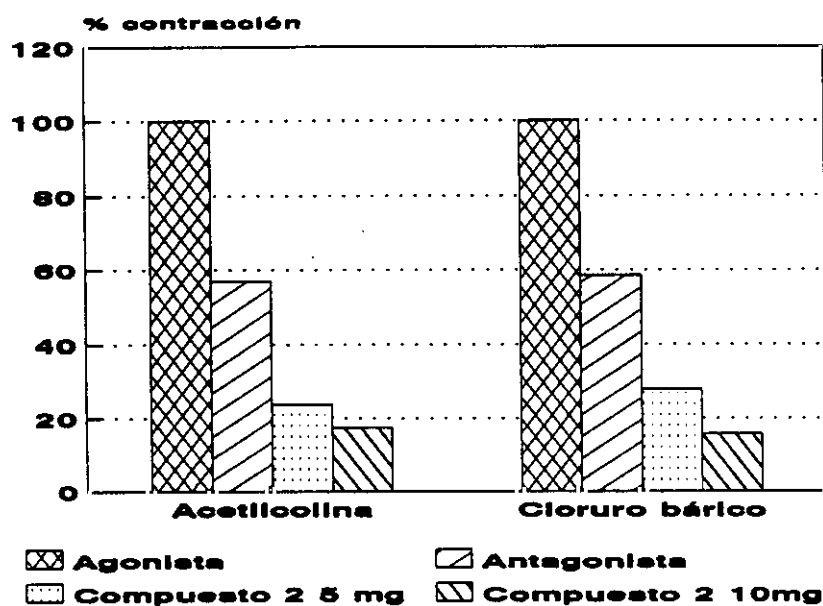


FIGURA 15. Actividad espasmolítica del compuesto 2 aislado de *S.m.magnolii* frente a la contracción inducida por acetilcolina y cloruro bórico.

Porcentajes de máxima concentración.



DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevas moléculas con actividad farmacológica a partir de fuentes naturales, es una práctica habitual en numerosos centros de investigación, orientada siempre en base a las aplicaciones terapéuticas que estas plantas tienen en la medicina popular.

En el marco de un proyecto de investigación en esta misma línea, establecido en nuestro Departamento, se continuó el estudio iniciado en la Tesina de Licenciatura sobre *Sanguisorba minor* ssp. *magnolii*, especie vegetal utilizada a nivel popular en la provincia de Toledo y Ávila, en zonas próximas a Madrid.

En primer lugar se ha realizado un estudio histológico que permita establecer unas primeras bases para la identificación y diferenciación de esta planta medicinal:

Asimismo, se plantea un estudio fitoquímico encaminado a caracterizar los principios químicos presentes en la planta, y un posterior fraccionamiento cromatográfico para intentar aislar algún compuesto responsable de su actividad.

Los ensayos farmacológicos realizados con esta especie, están basados en las aplicaciones terapéuticas que esta planta tiene a nivel popular. Estos usos populares, fundamentalmente obedecen a las propiedades beneficiosas que presenta como tónico digestivo. En el ámbito rural de recolección, esta planta es considerada como un eficaz remedio contra la úlcera gastroduodenal.

De este modo, se han llevado a cabo una serie de pruebas sobre aparato digestivo, encaminadas a validar farmacológicamente sus efectos beneficiosos a este nivel, y de actividad hipoglucemiante. Todas estas pruebas farmacológicas se han realizado con la infusión al 5% de tallos y hojas, ya que es así como se utiliza en el ámbito local.

Desde el inicio de la terapéutica antiulcerosa con base científica, la práctica más frecuente ha sido el tratar de disminuir el desarrollo del ulcus gastroduodenal, frenando la secreción de jugo gástrico. De hecho, se han empleado ampliamente moléculas anticolinérgicas para inhibir tal secreción, como la atropina y derivados (Moron *et al.*, 1984).

Posteriormente, se llegó al uso de anticolinérgicos específicos, como la pirenzepina, que impiden la secreción del jugo gástrico al actuar sólo sobre determinados receptores, por lo que están exentos de los molestos efectos secundarios de los derivados atropínicos (Patty *et al.*, 1984; Takeda *et al.*, 1985; Carmine & Brogden, 1985).

Con un mecanismo de acción semejante, pero por una vía totalmente distinta, está el grupo de los antagonistas H_2 , que constituyó un verdadero hito en la terapéutica antiulcerosa, y cuyos principales representantes son la cimetidina y ranitidina (Brater *et al.*, 1982; Piper, 1983).

Posteriormente se incluyeron en la terapéutica el uso de inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lansoprazol...) siendo en la actualidad las sustancias más empleadas junto a los anti- H_2 (Florez, 1992).

Otra posible fuente de búsqueda de nuevos agentes antiulcerosos, es el bloqueo de la liberación ó de la actuación de la gastrina, uno de los más potentes estímulos fisiológicos de secreción ácida gástrica (Ishizaki *et al.*, 1971).

Dada las referencias populares sobre *S. minor magnolii*, y con objeto de abordar en mayor medida los factores desencadenantes de estas patologías ulcerosas, hemos englobado diferentes aspectos del aparato digestivo, en las pruebas farmacológicas realizadas con nuestra planta.

La infusión ha mostrado una marcada actividad antiulcerosa en dos modelos de inducción de úlcera experimental, siendo tan activa como la sustancia de referencia, ranitidina, potente antagonista H_2 .

Asimismo, presenta un ligero efecto inhibidor de la secreción ácida gástrica, así como de la motilidad gastrointestinal. Esta actividad se ve reflejada en un descenso significativo del número de heces producidas por los animales de experimentación, durante todo el periodo experimental. Con respecto a los ensayos de sialorrea en ratones, la infusión ha mostrado una marcada actividad anticolinérgica, que se mantiene estadísticamente significativa en el tiempo.

En los ensayos en órgano aislado, realizados con duodeno aislado de rata, la infusión ha mostrado una potente actividad espasmolítica frente a las contracciones inducidas por acetilcolina, inhibiendo ligeramente las inducidas por cloruro bórico. Este efecto es similar en potencia al del antagonista selectivo de la acetilcolina, atropina, sugiriendo un posible bloqueo de receptores colinérgicos, como mecanismo de acción espasmolítico de la infusión.

La utilización de tres modelos de inducción de úlceras que actúan por distintos mecanismos, permiten evaluar la actividad antiulcerosa, como en el caso de indometacina que actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, la actividad antisecretora en el caso de ligadura de píloro y la actividad citoprotectora frente al etanol (agente necrosante).

El hecho de que la infusión sea activa en los tres casos, se relaciona y concuerda con los resultados obtenidos en las otras pruebas, e indica que puede actuar por varios mecanismos, disminuyendo la producción de secreción ácida y/o aumentando la protección local de la mucosa. Esto puede ser debido a su demostrada, a distintos niveles, actividad anticolinérgica y también a la presencia de determinadas sustancias como taninos y mucílagos que actuarían a nivel local. En ambos casos, también se justificaría su actividad astringente y el efecto antisecretor.

En los ensayos de actividad hipoglucemiante, la infusión ha presentado también un marcado efecto, tanto en ratones normales como en ratones aloxanizados, permaneciendo significativo durante todo el experimento. Sin embargo, este efecto es más patente en ratones hiperglucémicos, a los que previamente se les había inducido una hiperglucemia experimental, por lo que se puede presuponer la eficacia de la infusión, en conseguir una normoglucemia de una forma prolongada.

Los ensayos fitoquímicos preliminares realizados con nuestra planta, indican la presencia de una amplia gama de compuestos químicos: flavonoides, saponinas, ácidos fenólicos, taninos, azúcares reductores y mucílagos (Rodríguez, 1984).

Por técnicas de CCF, y en ocasiones HPLC, hemos realizado una investigación cromatográfica de los ácidos fenólicos, azúcares, aminoácidos, heterósidos flavónicos y saponínicos presentes en nuestra planta, así como un estudio cualitativo por CG del aceite esencial.

Como ácidos fenólicos mayoritarios se han identificado, ácido vainílico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido gálico.

Los azúcares identificados, que presumiblemente formarán parte de las moléculas heterosídicas presentes en la infusión, son xilosa, fructosa y glucosa. Además, por HPLC, son identificados también, sacarosa y maltosa.

Con respecto a los heterósidos flavónicos, se han identificado quercetol y kemferol, como geninas que forman parte de la estructura de estas moléculas. La fracción glucídica está constituida mayoritariamente por glucosa y arabinosa. Estas sustancias flavónicas están asociadas a efectos antiulcerosos (Alcaraz & Hoult, 1985; Alarcón de la Lastra *et al.*, 1994) y espasmolíticos (Laekeman *et al.*, 1986; Choi *et al.*, 1991).

Como estructura saponínica mayoritaria, se ha identificado por CCF el ácido torméntico, molécula por otro lado, típica dentro del género *Sanguisorba* y con demostrada actividad hipoglucemiante (Potier *et al.*, 1966; Villar *et al.*, 1986; Ivorra *et al.*, 1988; Stachnrski *et al.*, 1995).

En el análisis cuali y cuantitativo de aminoácidos en nuestra especie, se observa la presencia de diferentes estructuras, en cantidades elevadas. Como aminoácidos mayoritarios, se han identificado glutámico, aspártico y alanina.

La complejidad estructural del aceite esencial de nuestra especie, no ha permitido identificar de una forma definitiva, su composición, aunque de una manera aproximada, se puede detectar como moléculas terpénicas mayoritarias, α -terpineno y borneol.

Junto a los compuestos identificados: quercetol, kemferol y ac.torméntico, como sustancias activas a las que pueda deber su actividad farmacológica la infusión, se logra aislar dos compuestos siguiendo la metodología expuesta en la parte experimental.

Con técnicas espectroscópicas, y relacionando los datos obtenidos con los aportados por la bibliografía, se llega a una aproximación de la estructura molecular de ambos compuestos.

La estructura del compuesto 1 respondería a un esqueleto triterpénico de tipo epoxidammarano.

Las saponinas con esqueleto dammarano derivan del grupo de saponinas tipo lanostano (Sharma *et al.*, 1996), constituyendo un amplio conjunto de saponinas triterpénicas conocidas en el reino vegetal. Han sido descritas mayoritariamente en las familias Araliaceae, Cucurbitaceae y Rhamnaceae, perteneciendo además a este grupo, los ginsenósidos aislados del Ginseng (Tanaka & Kasui, 1984; Watanabe *et al.*, 1988; Shukla & Thakur, 1988, 1990; Shu *et al.*, 1995; Baek *et al.*, 1996; Mahran *et al.*, 1996).

Aunque dentro del género *Sanguisorba* y familia *Rosaceae* en general, se han descrito una amplia gama de estructuras triterpénicas, no queda constancia en la bibliografía especializada del aislamiento de saponinas con esqueleto dammarano, dentro de sus especies, siendo ésta la primera vez.

De poder confirmar esta estructura para el compuesto 1, sería en *S. minor magnolii* la primera vez que apareciese reseñado un compuesto de este tipo dentro de este género.

Las saponinas triterpénicas presentan un amplio abanico de propiedades biológicas, de las que hablamos más extensamente en el apartado II.2 de la revisión bibliográfica de esta Memoria (Hostettman & Marston, 1995).

La posible estructura del compuesto 2 corresponde con una 5,7,3',4'-tetrahidroxiisoflavanona. Las estructuras de isoflavonoides no son muy abundantes en el reino vegetal, aunque se han descrito dentro de la familia *Rosaceae*. Se encuentran presentes en su inmensa mayoría dentro de la sub-familia Papilionoideae de las Leguminosas (Ingham, 1983).

Principios químicos de naturaleza isoflavanonónica se han descrito en los géneros *Erythrina* (Wandji & Tanee Fomum, 1995), y *Lupinus* (Souleles, 1990), y dentro de la familia *Rosaceae*, en la especie *Prunus pudhum* (Narasimhachari & Seshadri, 1952).

Dentro del género *Sanguisorba*, en concreto en la especie sometida a estudio, *S. minor magnolii*, es donde se describe por primera vez una molécula de naturaleza isoflavanonónica.

Los isoflavonoides presentan también un amplio rango de actividades biológicas, predominando su acción estrogénica, antifúngica y antibacteriana, así como sus propiedades insecticidas (Ibrahim & Abul-Hajj, 1990; Dey & Harborne, 1991), citotóxicas (Edwards *et al.*, 1979; Li *et al.*, 1993), y antivirales (Stossel, 1987; Konoshima *et al.*, 1988; Manikumar *et al.*, 1989). Los efectos estrogénicos de estos compuestos, presentes en muchos forrajes para la alimentación del ganado, han sido causa de los problemas de infertilidad detectados en algunos animales (Bickoff, 1968; Biggs *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 1989). Asimismo, los isoflavonoides poseen marcados efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Della Loggia *et al.*, 1989; Jha *et al.*, 1990; Van Acker *et al.*, 1996), así como actividad espasmolítica (Della Loggia *et al.*, 1988).

Con objeto de comprobar si ambos compuestos aislados son en parte responsables de la actividad de *S. minor magnolii*, se realiza un estudio farmacológico de los mismos.

El bajo rendimiento de las separaciones cromatográficas no ha permitido realizar la totalidad de las pruebas farmacológicas ensayadas con la infusión, por lo que con los compuestos aislados quedan reducidas a la determinación de la actividad hipoglucemiante, y su posible mecanismo espasmolítico en duodeno aislado de rata.

Al igual que la infusión, ambos compuestos han mostrado una marcada actividad hipoglucemiante, aunque este efecto no es tan prolongado en el tiempo. Tal y como cabría esperar por las referencias encontradas en la bibliografía especializada (Villar *et al.*, 1986; Ivorra *et al.*, 1988, 1989; Reher *et al.*, 1991c), la actividad hipoglucemiante es más marcada con el compuesto 1, molécula de naturaleza triterpénica.

En los ensayos en órgano aislado, el compuesto 1, al igual que la infusión, ha mostrado un marcado efecto espasmolítico frente a las contracciones inducidas por acetilcolina, inhibiendo ligeramente las inducidas por cloruro bórico. El compuesto 2 a su vez, se ha mostrado como un potente agente espasmolítico, inhibiendo casi por completo

las concentraciones inducidas por acetilcolina y cloruro bórico, con una potencia similar a los antagonistas selectivos, atropina y papaverina.

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo experimental y bibliográfico parece sumamente interesante continuar con el estudio de esta especie, *S. minor magnolii*, cuyo uso en medicina popular hemos podido corroborar en el laboratorio.

En un futuro inmediato, se iniciarán ensayos encaminados a aislar en mayor cantidad ambos compuestos, así como a profundizar en un amplio rango de actividades biológicas y posible mecanismo de acción.

Por otro lado, el aislamiento de nuevos principios con actividad farmacológica que pudieran contribuir a los efectos beneficiosos de la infusión, constituye línea de investigación prioritaria, a desarrollar con *S. minor magnolii*.

CONCLUSIONES

1.- Se establecen las claves histológicas necesarias para un control de identidad de esta planta medicinal, que podrían permitir una clasificación diferencial de *S.m.magnolii* de las otras subespecies.

2.- Los ensayos farmacológicos realizados con la infusión de *S.m.magnolii* permiten corroborar los usos terapéuticos que esta especie tiene en el ámbito popular, como tónico digestivo y antiulceroso. A nivel experimental se ha demostrado su actividad anticolinérgica, citoprotectora y astringente.

Asimismo se ha comprobado su actividad hipoglucemiante.

3.- Se identifican como componentes de la planta, por técnicas cromatográficas, ácidos fenólicos, aminoácidos y algunos componentes del aceite esencial.

4.- Se identifica en la infusión la presencia de quercetol y kemferol como geninas de los heterósidos flavónicos. Asimismo se identifica el ácido torméntico como saponina mayoritaria.

5.- Por técnicas de cromatografía en columna, se logra aislar dos compuestos activos, que contribuyen en la actividad farmacológica mostrada por la infusión.

Utilizando técnicas espectroscópicas adecuadas se logra, la elucidación estructural de estas dos moléculas:

A.- Uno de los principios corresponde a una saponina triterpénica con esqueleto epoxidammarano. Moléculas de esta naturaleza, no se han descrito hasta el momento dentro del género *Sanguisorba*.

B.- El segundo compuesto aislado correspondería a una 5,7,3',4'-tetrahidroxiisoflavanona. Este tipo de compuestos han sido descritos dentro de la familia *Rosaceae*, aunque es en *Sanguisorba minor magnolii*, donde se reseña por primera vez dentro de este género.

6.- Los ensayos farmacológicos realizados con ambos compuestos aislados, reflejan una marcada actividad hipoglucemiante y espasmolítica, contribuyendo así, a la actividad farmacológica de la infusión. No obstante, la presencia de otras moléculas activas dentro de esta planta, y que corroboren también los usos populares de la misma, se considera también muy probable.



BIBLIOGRAFÍA

ABAD, M.J., BERMEJO, P., VILLAR, A., VALVERDE, S. Anti-inflammatory activity of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum*. *J. Nat. Prod.* 56: 1164-1167 (1993).

ABDALLA, S.S., ABU ZARGA, M.H. Effects of cirsimaritin, a flavone isolated from *Artemisia judaica* on isolated guinea-pig ileum. *Planta Med.* 53: 322-324 (1987).

AFZAL, M., AL-SWEEDAN, N., MASSIH, L.A., TAKAHASHI, K., SHIBATA, S. 2-amino-5-(N-ethylcarboxamido)-pentamic acid from green tea leaves. *Planta Med.* 53: 109-119 (1987).

ALARCÓN DE LA LASTRA, C., MARTÍN, M.J., LA CASA, C., MOTILVA, V. Antiulcerogenicity activity of the flavonoid fraction from *Bidens aurea*: comparison with ranitidine and omeprazole. *J. Ethnopharmacol.* 42: 161-168 (1994).

ALCARAZ, M.J., HOULT, J.R.S. Actions of flavonoids and the novel antiinflammatory flavone, hypolaetin-8-glucoside on prostaglandin biosynthesis and inactivation. *Biochem. Pharmacol.* 34: 2477-2482 (1985).

AMOROS, M., FAUCONNIER, B., GIRRE, R.L. Effect of saponins from *Anagallis arvensis* on experimental herpes simplex keratitis in rabbits. *Planta Med.* 54: 128-131 (1988).

ANTON, R. Flavonoids and traditional medicine. *Prog. Clin. Biol. Res.* 280: 423-439 (1988).

ARIMURA, A., SATO, H., DU PONT, A., NISHI, N., SCHALLI, A.V. Abundance of immunoreactive GH-release inhibiting hormone in the stomach and pancreas of rat. *Fed. Proc.* 34: 273 (1975).

BADER, G., HILLER, K. Structure and pharmacology of triterpenoid saponins. *Pharmazie* 42: 577-597 (1987).

BAEK, N.I., KIM, D.S., LEE, Y.H., PARK, J.D., LEE, C.B., IL KIM, S. Ginsenoside Rh₄, a genuine dammarane glycoside from Korean red Ginseng. *Planta Med.* 62: 86-87 (1996).

BALANSARD, G., GAYTE-SORBIER, A., CAVALLI, C. Acides aminés de la Mousse de Corse *Alsidium helminthocorton* Kutzing, de *Jania rubens* Lamx. et de *Corallina officinalis* L. *Ann. Pharm. Fr.* 40: 527-534 (1982).

BANERJI, R., MISRA, G., NIGAM, S.K. *Madhuca indica* leaf saponin and its biological activity. *Fitoterapia* 56: 186-188 (1985).

BANIJAMALI, A.R., MARIYANNIS, A. Separation of tetrahydrocannabinol isomers by reverse-phase high pressure liquid chromatography. *J. Liquid. Chromatogr.* 10: 2931-2939 (1987).

BASROW, K.F., BORI, I.D., FUKUSHIMA, Y., KASHIWADA, Y., TANAKA, T., NONAKA, G., NISHIOKA, I., LEE, K.H. Inhibition of DNA topoisomerases by sanguin H-6, a cytotoxic dimeric ellagitannin from *Sanguisorba officinalis*. *Planta Med.* 59: 240-245 (1993).

BASU, N., RASTOGI, R.P. Triterpenoid saponins and sapogenins. *Phytochemistry* 6: 1249-1270 (1967).

BEDI, B.S., GUILLESPIES, G., GILLESPIR, J.E. Effects of a specific gastric antagonist on gastric acid secretion in pouch dogs. *Lancet* i: 1940-1943 (1967).

BEGLEY, M.J., CROMBIE, L., CROMBIE, W.M.L., WHITING, D.A.J. The isolation of avenacins A-1, A-2, B-1 and B-2. Chemical defences against cereal take-all disease. Structure of their aglycons, the avenestergens, and their anhydro dimers. *J. Chem. Soc.* 11: 1905-1915 (1986).

BENIGNO ROMÁN, F.S.C. "Tejidos vegetales", Ed. Bruño, Madrid, 1971.

- BENNETT, A. Effects of kinins and prostaglandins on the gut. *Proc. R. Soc. Med.* 64: 12-13 (1971).
- BERMEJO, P., GOMEZ-SERRANILLOS, M. Contribución a la determinación de azúcares en plantas por métodos cromatográficos. *Pharm. Med.* 14: 117-121 (1982).
- BERMEJO, P., MAS, E., SÁEZ, E., PARDO, P. Contribución al estudio de los compuestos flavónicos de la *Digitalis parviflora* Jacq. *Pharm. Med.* 15: 226-229 (1984a).
- BERMEJO, P., SÁEZ, E., PARDO, P. Contribución al estudio de los compuestos flavónicos de la *Digitalis toletana* F.Q. *Pharm. Med.* 15: 254-257 (1984b).
- BHARGAVA, K.P., GUPTA, M.B., TANGRI, K.K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *Eur. J. Pharmacol.* 22: 191-195 (1973).
- BICKOFF, E.M. "Commonwealth Bur. of Pastures and Field Crops", pp. 1-39, Ed. Hurley, Berkschire, England, 1968.
- BIGGS, D.R., SHAW, G.J., YATES, M.K., NEWMAN, R.H. Identification of 4',7-dihydroxy-2',3'-dimethoxy isoflavan in bean roots. *J. Nat. Prod.* 46: 742-744 (1983).
- BILIA, A.R., PALME, E., CATALANO, S., FLAMINI, G., MORELLI, I. New triterpenoid saponins from the roots of *Potentilla tormentilla*. *J. Nat. Prod.* 57: 333-338 (1994).
- BINDER, H.J. Pharmacology of laxatives. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17: 355-367 (1977).
- BIRK, Y. In "Food Science and Technology", p. 1691, Academic Press, New York, 1969.
- BLACK, J.W., DUNCAN, W.A.M., DURANT, C.J. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* 236: 385-390 (1972).

BLACK, J.W., DUNCAN, W.A.M., EMMETT, J.C., GANELLIN, C.R., HESSELBO, T., PARSONS, E.M., WYLLIE, J.H. Metiamide, an orally active histamine H₂-receptor antagonist. *Agents Actions* 3: 133 (1973).

BOYD, J.S., WORMSLEY, K.G. "Gastroenterología: esófago, estómago, duodeno", 4ªed., Ed. Salvat S.A., Barcelona, 1987.

BRATER, D.C., PETERS, M., ESHELMAN, F., RICHARDSON, T. "Clinical comparison of cimetidine and ranitidine". *Clin. Pharmacol. Ther.* 32:484-488 (1982).

BRUNETON, J. "Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia", Ed. Acribia S.A., Zaragoza, 1991.

BRYANT, H.H., FELTON, L.C., KRANZ, J.C.Jr. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 121: 210 (1957).

CABO TORRES, J., PARDO GARCIA, P. "Guía de prácticas de Farmacognosia", Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 1958.

CALIXTO, J.B., NICOLAU, M., RAE, G.A. Pharmacological actions of tannic acid. I. Effects on isolated smooth and cardiac muscles and on blood pressure. *Planta Med.* 52: 32-35 (1986).

CARMINE, A., BRODGEN, K. "Pirenzepine : a review of its pharmacodynamics and pharmacokinetics properties and therapeutic efficacy in peptic ulcers disease and other allied disease. *Drugs* 30: 85-104 (1985).

CATÁLOGO DE ESPECIALIDADES FARMACÉUTICAS, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1996.

CHEMLI, R., TOUMI, A., OUESLATI, S., ZOVAGHI, H., BOUKEF, K., BALANSARD, G. *Calendula arvensis*. Impact of saponins on toxicity, hemolytic effect, and antiinflammatory activity. *J. Pharm. Belg.* 45: 12-16 (1990).

CHOI, J.S., YOKOZAWA, T., OURA, H. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. *J. Nat. Prod.* 54: 218-224 (1991).

CHOPIN, J., DELLAMONICA, G. In "The Flavonoids: Advances in Research", Vol. 2, pp. 63-91, Chapman & Hall, London, 1988.

CLEARFIELD, H.R. *Helicobacter pylori*: agressor or innocent bystander. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 75: 815-829 (1991).

COHEN, S., LIPSHUTZ, W., HUGHES, W. Role of gastrin supersensitivity in the pathogenesis of lower esophageal sphinster hypertension in achalasia. *J. Clin. Invest.* 50: 1241-1247 (1971).

COHEN, S., MORRIS, D.W., SCHOEN, H.J. The effect of oral and intravenous metoclopramide on human lower esophaegal sphinter pressure. *Gastroenterology* 70: 484-487 (1976).

COLLINS, J.S. Role of *Helicobacter pylori* in gastritis and duodenitis in man. *Agents Actions* C47-49 (1992).

CONNOLLY, J.D., HILL, R.A. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 6: 475-501 (1989).

CORDELL, G.A. Selective INEPT spectroscopy: a powerful tool for the spectral assignement and structure elucidation of natural products. *Phytochem. Anal.* 2: 49-59 (1991).

CORTÉS BENAVIDES, F. "Cuadernos de histología vegetal", Ed. Marban, Madrid, 1986.

CORTHOUT, J., PIETERS, L., CLAESYS, M., GEERTS, St., VANDEN BERGHE, D., VLIETINCK, A. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. *Planta Med.* 60: 460-463 (1994).

COTELLE, N., BERNIER, J.L., CATTEU, J.P., POMMERY, J., WALLET, J.C., GAYDOU, E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Rad. Res. Comm.* 20: 35-43 (1996).

CRONQUIST, A. "An integrated system of classification of flowering plants", Columbia University Press, New York, 1981.

CUTLER, D.F. "Applied plant anatomy", Ed. Langman, London, 1978.

DANIEL, E.E. Electrical and contractile activity of the pyloric region in dogs and the effect of drugs. *Gastroenterology* 49: 403-418 (1965).

DE CLERQ, E. New selective antiviral agents active against the AIDs virus. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 339-345 (1987).

DE RODRIGUEZ, D.J., CHULIA, J., SIMOES, C.M.O., AMOROS, M., MARIOTTE, A.M., GIREE, L. Search for *in vitro* antiviral activity of a new isoflavonic glycoside from *Ulex europeus*. *Planta Med.* 56: 59-62 (1990).

DE TOMMASI, N., CONTI, C., STEIN, M.L., PIZZA, C. Structure and *in vitro* antiviral activity of triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. *Planta Med.* 57: 250-253 (1991).

DELAVEAU, P. "Secretos y virtudes de las plantas medicinales", Ed. Reader's Digest, México, 1982.

DELLA LOGGIA, R., ZILLI, C., DEL NEGRO, P., REDAELLI, C., TUBARO, A. Isoflavones as spasmolytic principles of *Piscidia erythrina*. *Prog. Clin. Biol. Res.* 280: 365-368 (1988).

DELLA LOGGIA, R., DEL NEGRO, P., TUBARO, A., BARONE, G., PARRILLI, M. Homoisoflavanones as anti-inflammatory principles of *Muscari comosum*. *Planta Med.* 55: 587-588 (1989).

DESMAISON, M., TIXIER, M. Acides aminés libres de Chataiques provenant de *Castanea sativa* Mill., *Castanea crenata* Sieb. et Zucc., *Castanea molissima* Blume et d'hybrides: *Castanea crenata* x *sativa*. *Ann. Pharm. Fr.* 42: 353-357 (1984).

DEY, P.M., HARBORNE, J.B. "Methods in plant biochemistry", Vol. 1, pp. 389-419, Academic Press, London, 1989.

DEY, P.M., HARBORNE, J.B. "Methods in plant biochemistry", Vol. 1, pp. 421-429, Vol. 6, pp. 261-280, Academic Press, London, 1991.

DIAK, J., KOHLMUNZER, S. Search for procyanidins from the roots of *Sanguisorba officinalis* and *Sanguisorba minor* (Rosaceae). *Herba Hung.* 22: 7-12 (1983) in C.A.101:187952f.

DILWARI, J.B., MISIEWICZ, J.J. Action of oral metoclopramide on the gastroesophageal junction in man. *Gut* 14: 380-382 (1973).

DOMENECH, J.M. "Bioestadística", pp 318-321, Ed. Herder, Barcelona, 1982.

DOMINGUEZ, X.A. "Métodos de investigación fitoquímica", Ed. Limusa, México, 1973.

EDWARDS, J.M., RAFFAUF, R.F., LE QUESNE, P.W. Antineoplastic activity and cytotoxicity of flavones, isoflavones and flavanones. *J. Nat. Prod.* 42: 85-91 (1979).

ESQUIVEL-HERRERA, E., UGALDE-VARGAS, A., KECKENRIDGE, C., MATA-SEGREDÁ, J.F. Protective effect on rat gastric mucosa of the mucopolysaccharide of *Triunfetta semitriloba*. *Fitoterapia* 58: 268-270 (1987).

ESSAU, K. "Anatomía de las plantas con semillas", Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 1982.

EZAKI, N., KATO, M., TAKIZAWA, N., MORIMOTO, S., NONAKA, G., NISHIOKA, I. Pharmacological studies on *Linderae umbellatae* Ramus, IV: Effects of condensed tannin related compounds on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. *Planta Med.* 51: 34-38 (1985).

FAHN, A. "Anatomía vegetal", Ediciones H. Blume, Madrid, 1978.

FARKAS, L., GOTTSEGEN, A., NOGRADI, M., ANTUS, S. Synthesis of the natural isoflavanones ferreirin, dalbergioidin, and ougenin. *J. Chem. Soc. C*: 1994-2000 (1971).

Farmacopea Oficial Española, 9ª ed., Estados, Artes Graficas, Madrid, 1954.

FAVEL, A., STEINMETZ, M.D., REGLI, P., VIDAL-OLLIVIER, E., ELIAS, R., BALANSARD, G. *In vitro* antifungal activity of triterpenoid saponins. *Planta Med.* 60: 50-53 (1994).

FILHO, R.B., GOTTLIEB, O.R., VIERIRA PINHO, S.L., MONTE, F.J.Q., DA ROCHA, A.I. Flavonoids from Amazonian Leguminosae. *Phytochemistry* 12: 1184-1186 (1973).

FINTELMANN, V. Possibilities and limits of phytotherapy of gastrointestinal diseases. *Z. Phytother.* 10: 29-30 (1989).

Flora Europea, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1976.

FLÓREZ, J. "Farmacología humana", 2ª ed., Masson-Salvat, Barcelona, 1992.

FLOWER, R.J. Drugs which inhibiting prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol. Rev.* 26: 33-66 (1974).

FONT-QUER, P. "El Dioscórides Renovado", Ed. Labor, Barcelona, 1979.

FONT-QUER, P. "Diccionario de Botánica", Ed. Labor S.A., Barcelona, 1989.

FRANCISCO, C.G., FREIRE, R., HERNÁNDEZ, R., SALAZAR, J.A., SUÁREZ, E., CORTÉS, M. Carbon-13 NMR study of (20,24)-epoxydammarane triterpenes. *Org. Magn. Res.* 22: 34-38 (1984).

FRANZ, G. Polysaccharides in Pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Med.* 55: 493-497 (1989).

FUJIOKA, T., IWASE, Y., OKABE, H., MIHASHI, K., YAMAUCHI, T. Studies on the constituents of *Actinostemma lobatum* Maxim. II. Structures of actinostemmosides G and M, new dammarane triterpene glycosides isolated from the herb. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 3870-3873 (1987).

FUKUI, H., GOTO, K., TABATA, M. Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 4174-4176 (1988).

GAO, F., CHEN, F.H., TANAKA, T., KASAI, R., SETO, T., TANAKA, O. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 37 (1985).

GASCÓ, L. "Teoría y Práctica de la Cromatografía en Fase Gaseosa", Ediciones J.E.N., Madrid, 1969.

GEIGER, C., SCHOLZ, E., RIMPLER, H. Ellagitannins from *Alchemilla xanthochlora* and *Potentilla erecta*. *Planta Med.* 60: 384-385 (1994).

GHOSH, M.N., SCHILD, H.O. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 13: 54-61 (1958).

GILLESPIR, G., McCUSKER, V.I., BEDI, B.S., DEBAS, H.T., GILLESPIR, J.E. Further experimental observations on the gastric acid secretion inhibitor Sc 15396. *Gastroenterology* 55: 81 (1968).

GIRARD, J.P., MARION, C., LIUTKUS, M., BOUCARD, M., RECHENCQ, E., VIDAL, J.P., ROSSI, J.C. Hypotensive constituents of marine algae; 1. Pharmacological studies of laminine. *Planta Med.* 54: 193-196 (1988).

GLISE, H. Epidemiology in peptic ulcer disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 25: 13-18 (1990).

GONZÁLEZ, M.E., MARTÍNEZ-ABARCA, F., CARRASCO, L. Flavonoids: potent inhibitor of poliovirus RNA synthesis. *Antiviral Chem. Chemother.* 1: 203-209 (1990).

GOODMAN GILMAN, A. "Las bases farmacológicas de la terapéutica", 7ª ed., Ed. Panamericana, México, 1986.

GUVANOV, I.A., LIBIZOV, N.J., GLADKILCH, A.S. Search for saponin containing plants among the flora of Central Asia and Southern Kazakhstan. *Farmasitya* 19: 23-31 (1970) in C.A.73:95408h.

GUYTON, A. "Tratado de Fisiología Médica", 7ªed., Ed. Interamericana, México, 1990.

HAMMERSCHMIDT, F.J., CLARK, A.M., SOLIMAN, F.M., EL-KASHOURI, E.S.A., EL-KAWY, M.M.A., EL-FISHAWY, A.M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Jasonia candicans* and *J. montana*. *Planta Med.* 59: 68-70 (1993).

HARBORNE, J.B. "Progress in Phytochemistry", Vol. 4, pp. 189-208, Pergamon Press, Frankfurt, 1977.

HARBORNE, J.B. "Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis", Chapman & Hall, London, 1984.

HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A. In "The Flavonoids: Advances in Research", Vol. 2, pp. 303-324, Chapman & Hall, London, 1988.

HASEGAWA, H., MATSUMIYA, S., UCHIYAMA, M., KUROKAWA, T., INOUE, Y., KASAI, R., ISHIBASHI, S., YAMASAKI, K. Inhibitory effect of some triterpenoid saponins on glucose transport in tumor cells and its application to *in vitro* cytotoxic and antiviral activities. *Planta Med.* 60: 240-243 (1994).

HASLAM, E. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 41: 1-46 (1982).

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59: 205-215 (1996).

HAYASHI, T., UCHIDA, K., HAYASHI, K., NIWAYAMA, S., MORITA, N. A cytotoxic flavone from *Scoparia dulcis* L. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 4849-4851 (1988).

HEGNAUER, R. "Chemotaxonomie der Pflanzen", Birkhauser Verlag, Basel, Stuttgart 1973.

HETHELYI, E., TETENYI, P., DABI, E., DANOS, B. The role of mass spectrometry in medicinal plant research. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 14: 627-632 (1987).

HIKINO, H., TOHKIN, M., KISO, Y., NAMIKI, T., NISHIMURA, S., TAKEYAMA, K. Antihepatotoxic actions of *Allium sativum* bulbs. *Planta Med.* 52: 163-168 (1986).

HILLER, K., VOIGT, G. Neue Ergebnisse in der Erforschung der Triterpensaponine. *Pharmazie* 32: 365-393 (1977).

- HILLER, K., ADLER, C. Neue Ergebnisse über Triterpensaponine. *Pharmazie* 37: 619-633 (1982).
- HIRABAYASHI, T., OCHIAI, H., SAKAI, S., NAKAJIMA, K., TERASAWA, K. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections *in vitro* and *in vivo*. *Planta Med.* 61: 221-226 (1995).
- HORIGOME, T., KUMAR, R., OKAMATO, K. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes *in vitro* and in the intestine of rats. *Br. J. Nutr.* 60: 275-285 (1988).
- HOSTETTMANN, K., HOSTETTMANN, M. "Performance Liquid Chromatography in Biochemistry", p. 599, VCH, Weinheim, 1985.
- HOSTETTMANN, K., HOSTETTMANN, M., MARSTON, A. "Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Products Isolation", p. 27, pp. 56-65, Springer-Verlag, Berlin, 1986.
- HOSTETTMANN, K., LEA, P.J. "Biologically Active Natural Products", p. 167, Press, Oxford, 1987.
- HOSTETTMANN, K., MARSTON, A. "Chemistry & Pharmacology of Natural Products: Saponins", Cambridge University Press, New York, 1995.
- HUKERI, V.I., KALYANI, G.A., KAKRANI, H.K. Hypoglycemic activity of flavonoids of *Phyllanthus fraternus* in rats. *Fitoterapia* 59: 68-70 (1988).
- HUSSEIN AYOUB, S.M., YANKOV, L.K. Algicidal properties of tannins. *Fitoterapia* 56: 227-229 (1985).

HWU, J.R., ROBL, J.A., KHOUDARY, K.P. Instrumentation and separation results of medium pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 25: 501-505 (1987).

IBRAHIM, A.R., ABUL-HAJJ, Y.J. Microbiological transformation of (\pm)-flavanone and (\pm)-isoflavanone. *J. Nat. Prod.* 53: 644-656 (1990).

INGHAM, J.L. *Fortschritte d. Chem Org. Naturst.* 43: 1-266 (1983).

ISHIMARU, K., HIROSE, M., TAKAHASHI, K., KOYAMA, K., SHIMOMURA, K. Tannin production in root culture of *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* 29: 3827-3830 (1990).

ISHIZAKI, O., SAITO, G., KAGIWADA, K. "Pharmacological study of proglumine 1. Effects of proglumine (KXM) on the gastric secretion and peptic ulcers. *Oyo Yokuri* 5:185-192 (1971).

IVORRA, M.D., PAYA, M., VILLAR, A. Hypoglycemic and insulin release effects of tormentic acid: a new hypoglycemic natural product. *Planta Med.* 54: 282-286 (1988).

IVORRA, M.D., PAYA, M., VILLAR, A. Effect of tormentic acid on insulin secretion in isolated rat islets of Langerhans. *Phytother. Res.* 3: 145-147 (1989).

IWAMOTO, M., FUJIOKA, T., OKABE, M., MIHASHI, K., YAMAUCHI, T. Studies on the constituents of *Actinostemma lobatum* Maxim. I. Structures of actinostemmosides A, B, C and D, dammarane triterpene glycosides isolated from the herb. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 553-561 (1987).

JAMES, S.L., PEARCE, E.J. The influence of adjuvant on induction of protective immunity by a non-living vaccine against schistosomiasis. *J. Immunol.* 140: 2753-2759 (1988).

JHA, H.C., VON RECKLINGHAUSEN, G., EGGE, H. Isoflavonoids from fermented soybeans as inhibitors of adryamicin-induced lipid peroxidation in microsomes. *Planta Med.* 56: 678-679 (1990).

JIA, Z.J., LIU, X.Q., LIU, Z.M. Triterpenoids from *Sanguisorba alpina*. *Phytochemistry* 32: 155-159 (1993).

JIMENEZ, C., CREWS, P. Novel marine sponge amino acids, 10. Xestoaminols from *Xestospongia* sp. *J. Nat. Prod.* 53: 978-982 (1990).

KAKIUCHI, N., HATTORI, M., NAMBA, T., NISHIZAWA, M., YAMAGISHI, T., OKUDA, T. Inhibitory effect of tannins on reverse transcriptase from RNA tumor virus. *J. Nat. Prod.* 48: 614-621 (1985).

KANETA, M., HIKICHI, H., ENDO, S., SUGIYAMA, N. Identification of flavones in nineteen Rosaceae species. *Agric. Biol. Chem.* 43: 657-658 (1979).

KASAI, R., MATSUMOTO, K., NIE, R.L., ZHOV, J., TANAKA, O. Glycosides from Chinese medicinal plant, *Hemsleya panacis-scandens*, and structure-taste relationship of curcubitane glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 234-243 (1988).

KIM, Y.S., ROH, J.E., ANN, H.S. Compositional analysis of polysaccharide from *Sanguisorba officinalis* and its anticoagulant activity. *Korean J. Pharmacogn.* 24: 124-130 (1993) in C.A.119:210371y.

KIMURA, Y., OKUDA, H., OKUDA, T., HATANO, T., AGATA, I., ARICHI, S. Studies on the activities of tannins and related compounds; V¹. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Planta Med.* 50: 473-477 (1984).

KIMURA, Y., OKUDA, H., OKUDA, T., ARICHI, S. Studies on the activities of tannins and related compounds; VIII. Effects of geraniin, corilagin and ellagic acid isolated from *Geranii herba* on arachidonate metabolism in leukocytes. *Planta Med.* 52: 337-338 (1986).

KINGSTON, D.G.I. High performance liquid chromatography of natural products. *J. Nat. Prod.* 42: 237-260 (1979).

KONOSHIMA, T., OKAMOTO, E., KOZUKA, M., NISHINO, H., TOKUDA, H., TANABE, M. Studies on inhibitors of skin tumor promotion, III. Inhibitory effects of isoflavonoids from *Wisteria brachybotrys* on Epstein-Barr virus activation. *J. Nat. Prod.* 51: 1266-1270 (1988).

KOSUGE, T., ISHIDA, H., YOKOTA, M., YOSHIDA, M. Studies of antihemorrhagic substances in herbs clasified as hemostatics in Chinese medicine. III. On the antihemorrhagic principle in *Sanguisorba officinalis* L. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 4478-4481 (1984).

KRYLOVA, I.L., ORISHCHENKO, N.D. Yield of below-ground organs of *Sanguisorba officinalis* from western Siberia and their tannin content. *Rastit. Resur.* 14: 553-557 (1978) in C.A.90:19058e.

LAEKEMAN, G.M., CLAEYS, M., RWANGABO, P.C., HERMAN, A.G., VLIETINCK, A.J. Cardiovascular effects of 3-methylquercetin. *Planta Med.* 52: 433- 437 (1986).

LAMAISSON, J.L., CARNAT, A., PETITJEAN-FREYTET, C. Tannin content and elastase inhibiting activity in the Rosaceae family. *Ann. Pharm. Fr.* 48: 335-340 (1990).

LAZARO E IBIZA, B. "Botánica Descriptiva", Ed. Hernando & Cia., Madrid, 1896.

LEE, S.W., LEE, J.S., KIM, Y.H., JIN, K.D. Effect of ginseng saponins on the sodium-potassium ATPase of dog cardiac sarcolemma. *Arch. Pharmacol. Res.* 9: 29-38 (1986).

LEE, K.H., LIN, Y.M., WU, T.S., ZHANG, D.C., YAMAGISHI, T., HAYASHI, T., HALL, I.H., CHANG, J.J., WU, R.Y., YANG, T.H. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. *Planta Med.* 54: 308-311 (1988).

LEI, W., SHI, Q., YU, S. Analgesics and CNS inhibitory effects of total saponins from the leaves of *Panax notoginseng*. *Zhong. Tong.* 9: 134-137 (1984) in C.A.101:103905g.

LEUTERT, T.H., VON ARX, E. Preparative medium-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 292: 333-344 (1984).

LEVY, M., ZEHAVID, V., NAIM, M., POLACHEK, I. An improved procedure for the isolation of medicagenic acid 3-O-b-D-glucopyranoside from alfalfa roots and its antifungal activity of plant pathogens. *J. Agric. Food. Chem.* 34: 960-963 (1986).

LI, L., WANG, H.K., CHANG, J.J., McPHAIL, A.T., McPHAIL, D.R., TERADA, H., KONOSHIMA, T., KOKUMAI, M., KOZUKA, M., ESTES, J.R., LEE, K.H. Antitumor agents, 138. Rotenoids and isoflavones as cytotoxic constituents from *Amorpha fruticosa*. *J. Nat. Prod.* 56: 690-698 (1993).

LIN, T.M., SPRAY, G.F. Choledochal hepatic and cholecystokinetic actions of secretin (S); potentiation by cholecystokinine (CCK). *Gastroenterology* 60: 783 (1971).

LIU, C.X., XIAO, P.G. Recent advances on ginseng research in China. *J. Ethnopharmacol.* 36: 27-38 (1992).

LIVINGSTONE, L.D. "Pharmacological experiments on isolated preparations", Department of Pharmacology, University of Edinburgh, E&S, 1968.

LOZANO, C. "Pregrado gastroenterología: hígado y páncreas", 5ª ed., Luzan 5 S.A., Madrid, 1988.

LUTETE, T., KAMBU, K., NTONDELE, D., CIMANGA, K., LUKI, N. Antimicrobial activity of tannins. *Fitoterapia* 3: 276-278 (1994).

MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. "The Sistematic Identification of Flavonoids", pp. 41-57, Springer-Verlag, Berlin, 1970.

MAHRAN, G.E.H., GLOMBITZA, K.W., MIRHOM, Y.W., HARTMANN, R., MICHEL, C.G. Novel saponins from *Zizyphus spina-christi* growing in Egypt. *Planta Med.* 62: 163-165 (1996).

MAJESTER-SAVORNIN, B., ELIAS, R., DIAZ-LANZA, A.M., BALANSARD, G., GASQUET, M., DELMAS, F. Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity. *Planta Med.* 57: 260-262 (1991).

MANIKUMAR, G., GAETANO, K., WANI, M.C., TAYLOK, H., HUGHES, T.J., WARNER, J., McGIUNEY, R., WALL, M.E. Plant antimutagenic agents, 5. Isolation and structure of two new isoflavones, fremantin and fremontone from *Psoralea fremontii*. *J. Nat. Prod.* 52: 769-773 (1989).

MARKHAM, K.R., CHARI, V.M. In "The Flavonoids: Advances in Research", pp. 19-134, Chapman & Hall, London, 1982.

MARSTON, A., POTTERAT, O., HOSTETTMANN, K. Isolation of biologically active plant constituents by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 450: 3-11 (1988).

MARTÍNEZ, J., SILVÁN, A.M., ABAD, M.J., BERMEJO, P., SÖLLHUBER, M., VILLAR, A. Isolation of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum* as PMA-induced ear edema inhibitors. *J. Nat. Prod.* 60: 142-144 (1997).

MEL'CHAKOVA, T.N., KHARITONOVA, N.P. Effect of habitat conditions and vegetation phases on the accumulation of tannis in the rhizome and roots of a burnet growing in the Perm Region. *Permsk. Gos. Farm. Inst.* 8: 99-103 (1975) in C.A.88:3127z.

MERTZ, H.R., WALSH, J.H. Peptic ulcer pathophysiology. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 75: 799-814 (1991).

METCALFE, C.R., CHALK, L. "Anatomy of the Dicotyledons", Oxford at the Clarendon Press, London, 1965.

MILLER, R.W., SPENCER, G.F., PUTNAM, A.R. (-)-5'-methoxysativan, a new isoflavan from alfalfa. *J. Nat. Prod.* 52: 634-636 (1989).

MILLER, T., WITTSTOCK, U., LINDEQUIST, U., TEUSCHER, E. Effects of some components of the essential oil of Chamomile, *Chamomilla recutita*, on histamine release from rat mast cells. *Planta Med.* 62: 60-61 (1996).

MIQUEL, J., QUINTANILHA, A.T., WEBER, H. "Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine", Vol. II, pp. 77-85, CRC Press Inc., Palo Alto, California, 1989.

MIZUNO, T., UCHINO, K., TOUKAIRIN, T., TANABE, A., NAKASHIMA, H., YAMAMOTO, N., OGAWARA, H. Inhibitory effect of tannic acid sulfate and related sulfates on infectivity, cytopathic effect, and Giant cell formation of human immunodeficiency virus. *Planta Med.* 58: 535-539 (1992).

MONBOISSE, J.C., BRAQUET, P., RANDOUX, A., BOREL, J.P. Non-enzymatic degradation of acid-soluble calf skin collagen by superoxide ion : protective effect of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 32: 53-57 (1983).

MORI, A., NISHINO, C., ENOKI, N., TAWATA, S. *Phytochemistry* 26: 2231- (1987).

MORON, F., PENA, C., CUEST, E., MOZSIK, G., JAVOR, T. "Comparative study of the cytoprotective effects of anticholinergic agents on the gastric mucosal lesions produced by intragastric administration of 0,6 M Hcl in rats. *Acta physiol. Hung.* 64:247-252 (1984).

MURAKAMI, S., ISOBE, Y., KIJIMA, H., NAGAI, H., MURAMATU, M., OTOMO, S. Inhibition of gastric H^+ , K^+ -ATPase and acid secretion by ellagic acid. *Planta Med.* 57: 305-308 (1991).

MÜTSCH-ECKNER, M., ERDELMEIER, C.A.J., STICHER, O., REUTER, H.D. A novel amino acid glycoside and three amino acids from *Allium sativum*. *J. Nat. Prod.* 56: 864-869 (1993).

NAKAYAMA, K., FUJINO, H., KASAI, R., TANAKA, O., ZHOU, J. Saponins of pericarps of Chinese *Sapindus delavagi* (Pyi-shian-tzu), a source of natural surfactants. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 2209-2213 (1986).

NARASIMHACHARI, N., SESHADRI, T.R. *Proc. Indian Acad. Sci.* 35A: 202- (1952).

NELSON, E., SOMOGYI, K. In "Practical Clinical Biochemistry", p.89, Arnold Heinemann, 1975.

NONAKA, G., TANAKA, T., NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Part 3. A new phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone and three new elagitannins, sanguins H-1, H-2 and H-3 from *Sanguisorba officinalis*. *J. Chem. Soc.* 4: 1667-1673 (1982).

NONAKA, G., ISHIMARU, K., TANAKA, T., NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XVII. Galloyl-homo-meloses from *Castanea crenata* L. and *Sanguisorba officinalis* L. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 483-489 (1984).

NONAKA, G.I., NISHIOKA, I., YAMAGISHI, T., KASHIWADA, Y., DUTSCHMAN, G.E., BADNER, A.J., KILKUSKIE, R.E., CHENG, Y.G., LEE, K.H. Anti-AIDs agents. 2. Inhibitory effect of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.* 53: 587-595 (1990).

OAKOVLEV, A.I., KONOPLIA, A.I., LASKOVA, I.L., KEDROUSKAIA, N.N. The mechanism of the immunostimulating action of plant heteropolysaccharides. *Farmakol. Toksikol.* 51: 68-72 (1988).

OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T. New methods of analyzing tannins. *J. Nat. Prod.* 52: 1-31 (1989a).

OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Med.* 55: 117-122 (1989b).

PAKRASHI, A., RAY, H., PAL, B.C., MAHATO, S.B. Sperm immobilizing effect of triterpene saponins from *Acacia auriculiformis*. *Contraception* 43: 475-483 (1991).

PALOMINO, O.M., GÓMEZ-SERRANILLOS, P., CARRETERO, E., VILLAR, A. High-performance liquid chromatography of flavonoids from *Sideritis* species. *J. Chromatogr.* 731: 103-108 (1996).

PARIS, R.R., MOYSE, H. "Matière Médicale", Masson et Cie., Paris, 1976.

PARIS, R., MURGU, L. "Plantes Médicinales et Phytothérapie", Vol 2, Ed. Masson et Cie, Paris, 1970.

PARNAS, B.L., DURLEY, R.C., RHODEN, E.C., KILPATRICK, B.F., MAKKAR, N., THOMAS, K.N., SMITH, W.G., CORLEY, D.G. Isolation and structure of leukotriene-A₄ hydrolase inhibitor: 8(S)-amino-2(R)-methyl-7-oxononanoic acid produced by *Streptomyces diastaticus*. *J. Nat Prod.* 59: 962-964 (1996).

PATHAK, D., PATHAK, K., SINGLA, A.K. Flavonoid as medicinal agents.- Recent advances. *Fitoterapia* 63: 371-389 (1991).

PATTITUCCI, M.L., PINTO, A.C., CARDOSO, J.N. Analysis of crude extracts and fractions of Brazilian Polypodiaceae by high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. I. Triterpenes. *Phytochem. Anal.* 6: 38-44 (1995).

PATTY, I., TARNOK, F., SIMON, L., JAVOR, T., DEAK, G., BENEDEK, S. "A comparative dynamic study of the effectiveness of gastric cytoprotection by vitamin A, sucralfate and ulcer healing by pirenzepine in patients with chronic gastric ulcer". *Acta Physiol. Hung.* 64:379-384 (1984).

PEANA, A., SATTA, M., MORETTI, M.D.L., ORECCHIONI, M. A study of choleretic activity of *Salvia desoleana* essential oil. *Planta Med.* 60: 478-479 (1994).

PETERSEN-LEHMANN, J., MORCK, H. Phytotherapy in gastroenterology. *Pharm. Z.* 133: 36-37 (1988).

PIPER, D.W. "Drugs for the prevention of peptic ulcer recurrence". *Drugs* 26:438-445 (1983).

POTIER, P., DAS, B.C., BUI, A.M., JANOT, M., POURRAT, A., POURRAT, H. Structure de l'acide tormentique, acide triterpénique pentacyclique isolé des racimes de *Potentilla tormentilla* Neck (Rosaceae). *Bull. Soc. Chim. Franc.* 11: 3458-3465 (1966).

POURRAT, A., POURRAT, H., POTIER, P. Sur la composition du *Poterium spinosum* L. (Rosacées). *Ann. Pharm. Franc.* 31: 321-324 (1973).

QUETIN-LECLERCQ, J., ELIAS, R., BALANSARD, G., BASSLEER, R., ANGENOT, L. Cytotoxic activity of some triterpenoid saponins. *Planta Med.* 58: 279-281 (1992).

RAINOVA, L., NAKOV, N., BOGDANOVA, S., MINKOV, E., STANEVA-STOYCHEVA, D. Ulceroprotective activity of the flavonoids of *Genista rumelica* Vel. *Phytother. Res.* 2: 137-139 (1988).

RASETTI, M.F., COLOMBO, M.L., BOSISIO, E., DE ANGELIS, L., GALLI, G., TOMÉ, F. Fast ion bombardement mass spectrometry of sanguinarine and coptisine from *Chelidonium majus*. *Phytochem. Anal.* 6: 135-140 (1995).

RECIO, M.C., GINER, R.M., MAÑEZ, S., RIOS, J.L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.* 61: 182-185 (1995).

REHER, G., REZNICEK, G., BAUMANN, A. Triterpenoids from *Sarcopoterium spinosum* and *Sanguisorba minor*. *Planta Med.* 57: 506 (1991a).

REHER, G. The triterpenoid and fatty acid pattern of several genera of the Rosoideae (Rosaceae). *Planta Med.* 57: A76 (1991b).

REHER, G., SLJEPCEVIC, M., KRAUS, L.J. Hypoglycemic activity of triterpenes and tannins from *Sarcopoterium spinosum* and two *Sanguisorba* species. *Planta Med.* 57: A57-A58 (1991c).

REN, D.L., WANG, J.Z., NODA, H., AMANO, H., OGAWA, S. The effects of an algal polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice. *Planta Med.* 61: 120-125 (1995).

RIVAS GODAY, S. "Vegetación y flora de la cuenca extremeña del Guadiana". Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Madrid, 1964.

RODES, J., PIQUE, J.M. "Patología de la secreción gástrica: úlcera péptica gastroduodenal", Ed. Doyma S.A., Barcelona, 1991.

RODRIGUEZ, M.J. "Contribución al estudio farmacognóstico de la *Sanguisorba minor magnolii* Spach". Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Madrid, 1984.

ROMUSSI, G., FALSONE, G., CREA, E.G.A., FINNER, E. *Arch. Pharm.* 316: 499 (1983).

RUDI, A., KASHMAN, Y., BENAYAHU, Y., SCHLEYER, M. Amino acid derivatives from the marine sponge *Jaspis digonoxea*. *J. Nat. Prod.* 57: 829-832 (1994).

SÁEZ, E., BERMEJO, P. Flavonoides en las hojas de *Digitalis toletana* F.Q. *An. Real Acad. Farm.* 51: 591-596 (1985a).

SÁEZ, E., RODRÍGUEZ, M.J., BERMEJO, P. Contribución al estudio de los ácidos fenólicos en dos especies de *Nepeta* L.: Hojas. *An. Real Acad. Farm.* 51: 597-604 (1985b).

SÁEZ, E., RODRÍGUEZ, M.J., BERMEJO, P. Ácidos fenólicos en dos especies de *Nepeta* L.: Tallos. *An. Real Acad. Farm.* 52: 113-119 (1986).

SAKAGAMI, H., IKEDA, M., UNTEN, S., TAKEDA, K., MURAYAMA, J., HAMADA, A., KIMURA, K., KOMATSU, N., KONNO, K. Antitumor activity of polysaccharide fractions from pine cone extracts of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. *Anticancer. Res.* 7: 1153-1159 (1987).

SAKURAI, M.H., MATSUMOTO, T., KIYOHARA, H., YAMADA, H. Detection and tissue distribution of anti-ulcer pectic polysaccharides from *Bupleurum falcatum* by a polyclonal antibody. *Planta Med.* 62: 347-351 (1996).

SANCHEZ MATA, D. *Lazaroa* 3: 367-369 (1981).

SANCHEZ MATA, D., BELMONTE, D. *Lazaroa* 5: 237-241 (1983).

SANTOS, M.S., FERREIRA, F., FARO, C., PIRES, E., CARVALHO, A.P., CUNHA, A.P., MACEDO, T. The amount of GABA present in aqueous extract of Valerian is sufficient to account for [³H]GABA release in synaptosomes. *Planta Med.* 60: 475-476 (1994).

SANTOS, F.A., RAO, V.S.N., SILVEIRA, E.R. The leaf essential oil of *Psidium guyanensis* offers protection against pentylenetetrazole-induced seizures. *Planta Med.* 63: 133-135 (1997a).

SANTOS, F.A., RAO, V.S.N., SILVEIRA, E.R. Anti-inflammatory and analgesic activities of the essential oil of *Psidium guianense*. *Fitoterapia* 1: 65-68 (1997b).

SCHIESSEL, R., FEIL, W., WENZEL, E. Mechanism of stress ulceration and implications for treatment. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 19: 101-120 (1990).

SCHIMMER, O., LINDENBAUM, M. Tannins with antimutagenic properties in the herb of *Alchemilla* species and *Potentilla anserina*. *Planta Med.* 61: 141-145 (1995).

SCHINDLER, B.A., RAMCHANDANI, D. Psicologic factors associated with peptic ulcer disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 75: 865-876 (1991).

SCHÖPKE, T.H., HILLER, K. Triterpenoid saponins. *Pharmazie* 45: 313-342 (1990).

SCHUSTER, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 431: 271-284 (1988).

SEO, S., TOMITA, Y., TORI, K. *Tetrahedron Lett.* 7-10 (1975).

SETO, T., TANAKA, T., TANAKA, O., NARUHASHI, N. *Phytochemistry* 23: 2829 (1984).

SHARMA, S.K., ALI, M., SINGH, R. New 9b-lanostane type triterpenic and 13,14-seco-steroidal esters from the roots of *Artemisia scoparia*. *J. Nat. Prod.* 59: 181-184 (1996).

SHAY, H., COMAROV, S.A., MERANZE, D., GRUNSTEIN, M., SIPLER, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5: 43-61 (1945).

SHEEHAN, E.W., ZEMAITIS, M.A., SLATKIN, D.J., SHIFF Jr., P.L. A constituent of *Pterocarpus marsupium*. (-)-Epicatechin as a potential antidiabetic agent. *J. Nat. Prod.* 46: 232-234 (1983).

SHELLARD, E.J. Medicines from plants with special reference to herbal products in Great Britain. *Planta Med.* 53: 121-123 (1987).

SHIBATA, S., TANAKA, O., SHOJI, J., SAITO, H. In: "Economic and Medicinal Plant Research", Vol. 1, pp. 217-284, Academic Press, London, 1985.

SHIGENAGA, S., KOUNO, I., KAWANO, N. *Phytochemistry* 24: 115 (1985).

SHU, R.G., XU, C.R., LI, L.N., YU, Z.L. Cyclocariosides II and III: two secodammarane triterpenoid saponins from *Cyclocarya paliurus*. *Planta Med.* 61: 551-553 (1995).

SHUKLA, Y.N., THAKUR, R.S. Saponins of *Panax pseudo-ginseng* subsp. *himalaicus* var. *angustifolius* rhizomes. *Planta Med.* 54: 367-368 (1988).

SHUKLA, Y.N., THAKUR, R.S. Leaf saponins of *Panax pseudo-ginseng* subsp. *himalaicus* and its varieties var. *angustifolius* and var. *bipinnatifidus*. *Fitoterapia* 6: 551 (1990).

SHUKLA, B., VISEN, P.S., PATNAIK, G.K., TRIPATHI, S.C., SRIMAL, R.C., DAYAL, R., DOBHAL, P.C. Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from *Eucalyptus hybrid*. *Phytother. Res.* 6: 74-79 (1992).

SHUKYUROV, D.E., NASUDARI, A.A. Chemical composition of Surnet (*Poterium*) grown in Azerbaidzhan. *Dokl. Akad. Nauk. Azerb. SSR.* 26: 84-88 (1970) in C.A.75:16090p.

SIMON, A., NAJID, A., CHULIA, A.J., DELAGE, C., RIGAUD, M. Inhibition of lipoxxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Callum vulgaris*). *Biochim. Biophys. Acta* 1125: 68-72 (1992).

SLOWING, K., SOLLHUBER, M., CARRETERO, M.E., VILLAR, A. Flavonoid glycosides from *Hibiscus sabdarifa*. *Phytochemistry* 37: 255-258 (1994).

SMITH, K.C., WHITE, R.L., LE, Y., VINING, L.C. Isolation of N-acetyl-3,4-dihydroxy-L-phenylalanine from *Streptomyces akiyoshiensis*. *J. Nat. Prod.* 58: 1274-1277 (1995).

SOULELES, C.H.R. A new isoflavone from *Lupinus hirsutus*. *J. Nat. Prod.* 53: 1340-1341 (1990).

STACHNRSKI, L., BEDNAREK, E., DOBROWOLSKI, J.Cz., STRZELECKA, H., MAZUREK, A.P. Tormentoside and two of its isomers obtained from the rhizomes of *Potentilla erecta*. *Planta Med.* 61: 94-95 (1995).

STAHL, E. "Thin-Layer Chromatography", 2^a ed., pp. 86-105, Springer-Verlag, Berlin, 1969.

STAHL, E. "Drug analysis by chromatography and microscopy", Ann. Arboc. Science Publishers, INC, Berlin, 1973.

STEINER, D.F., HALLUND, O., RUBENSTEIN, A.H., CHO, S., BAYLISS, C. Isolation and properties of proinsulin, intermediate forms and other minor components from crystalline bovine insulin. *Diabetes* 17: 725-736 (1968).

STILL, C.W., KAHN, M., MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* 43: 2923-2925 (1978).

STOSSEL, P. Effect of some soybean and bean phytoalexins and related isoflavonoids on growth of *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* 33: 461-464 (1987).

STRASBURGER, E. "Tratado de Botánica", Ed. Marin, Barcelona, 1974.

SZABO, S., GOLDBERG, I. Experimental pathogenesis: drugs and chemical lesions in the gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 25: 1-8 (1990).

TAKAHASHI, R.N., DE LIMA, T.C.M., MORATO, G.S. Pharmacological actions of tannic acid; II. Evaluation of CNS activity in animals. *Planta Med.* 56: 272-275 (1986).

TAKECHI, M., TANAKA, Y., TAKEHARA, M., NONAKA, G.I., NISHIOKA, I. Structure and antiherpetic activity among the tannins. *Phytochemistry* 24: 2245-2250 (1985).

TAKEDA, F., KITAGAWA, H., KOHEI, H. "Gastric cytoprotection by pirenzepine in rats: evaluating methods for cytoprotective activity by antisecretory agents ". *Jpn. J. Pharmacol.* 38:337-346 (1985).

TAMAI, M., WATANABE, N., SOMEYA, M., KONDOH, H., OMURA, S., ZHANG, P.L., CHANG, R., CHEN, W.M. New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*. *Planta Med.* 55: 44-47 (1989).

TANAKA, O., KASAI, R. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 46: 1-76 (1984).

TANAKA, T., NONAKA, G., NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Part XIV. 7-O-galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloyl procyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* 22: 2575-2578 (1983).

TANAKA, T., NONAKA, G., NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XVI. Isolation and characterization of six methyl glucoside gallates and a gallic acid glucoside gallate from *Sanguisorba officinalis* L. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 117-121 (1984).

TANAKA, T., NONAKA, G., NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. Part 28. Revision of the structures of sanguins H-6, H-2 and H-3, and isolation and characterization of sanguin H-11, a novel tetrameric hydrolyzable tannin, and seven related tannins from *Sanguisorba officinalis*. *J. Chem. Res.* 6: 176-177 (1985).

THERON, E., HOLEMAN, M., POTIN-GAUTIER, M., PINEL, R. Authentication of *Rovensara aromatica* and *Rovensara anisata*. *Planta Med.* 60: 489-491 (1994).

TIRILLINI, B., ROJAS VELASQUEZ, E., PELLEGRINO, R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. *Planta Med.* 62: 372-373 (1996).

TODA, S., KUMURA, M., OHNISHI, M. Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Med.* 57: 8-10 (1991).

TOMODA, M., SHIMIZU, N., OSHIMA, Y., TAKAHASHI, M., MURAKAMI, M., HIKINO, H. Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. *Planta Med.* 53: 8-12 (1987).

TORI, K., SEO, S., TONITA, Y. *Chem. Ind.* 435-436 (1975).

TORI, M., MATSUDA, R., SONO, M., ASAKAWA, Y. ^{13}C NMR assignment of dammarane triterpenes and dendropanoxide: application of 2D long-range ^{13}C - ^1H correlation spectra. *Magn. Res. Chem.* 26: 581-590 (1988).

TRABACE, L., AVATO, P., MAZZOCCOLI, M., SIRO-BRIGIANO, G. Choloretic activity of some typical components of essentials oils. *Planta Med.* 58: A650 (1992).

TREASE, G.E., EVANS, W.C. "Tratado de Farmacognosia", Ed. Interamericana, México, 1986.

TSUKAGOSHI, S. Lentinan, a new polysaccharide for the treatment of cancer. *Drugs Today* 24: 91-95 (1988).

TUBARO, A., TRAONI, E., DEL NEGRO, P., GALLI, C.L., DELLA LOGGIA, R. Anti-inflammatory activity of a polysaccharidic fraction of *Echinacea angustifolia*. *J. Pharm. Pharmacol.* 39: 567-569 (1987).

UBEDA, A., VILLAR, A. Relaxant actions of khellin on vascular smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 236-241 (1989).

UCHIDA, S., OHTA, H., EDAMATSU, R., HIRAMATSU, M., MORI, A., NONAKA, G., NISHIOKA, I., NIWA, M., AKASHI, T., OZAKI, M. Active oxygen free radicals are scavenged by condensed tannins. *Prog. Clin. Biol. Res.* 280: 135-138 (1988).

VAN ACKER, S.A.B.E., VAN DEN BERG, D.J., TROMP, M.N.J.L., GRIFFIDEN, D.H., VAN BENNEKOM, W.P., VAN DER VIJGH, W.J.F., BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 331-342 (1996).

VAN HOOF, L., VANDEN BERGHE, D.A., HATFIELD, G.M., VLIETINCK, A.J. Plant antiviral agents. V. 3-methoxy-flavones as potent inhibitor of viral-induced block of cell synthesis. *Planta Med.* 50: 513-517 (1984).

VERHAEREN, E.H.C., LEMLI, J. The effect of gallotannins and (+)-catechin on the stimulated fluid secretion on the colon, following a rehin perfusion in guinea pigs. *Planta Med.* 52: 269-272 (1986).

VILLAR, A., GASCÓ, M.A., ALCARAZ, M.J., MÁÑEZ, S., CORTÉS, D. Hypolaetin-8-O-glucoside, an antiinflammatory flavonoid from *Sideritis mugronensis*. *Planta Med.* 51: 70-72 (1985).

VILLAR, A., PAYÁ, M., HORTIGUELA, M.D., CORTÉS, D. Tormentic acid, a new hypoglycemic agent from *Poterium ancistroides*. *Planta Med.* 52: 43-45 (1986).

VILLAR, A., GASCÓ, M.A., ALCARAZ, M.J. Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 39: 502-505 (1987).

VOIRIN, B. UV spectral differentiation of 5-hydroxy-and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B-rings. *Phytochemistry* 22: 2107-2145 (1983).

WAGNER, H., OTT, S., JURCIC, K., MORTON, J., NESZMELYI, A. *Planta Med.* 48: 136 (1983).

WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKI, E.M. "Plant Drug Analysis" Springer-Verlag, Berlin, 1984.

WANDJI, J., TANEE FOMUM, Z. Erysenegalenseins B and C, two new prenylated isoflavanones from *Erythrina senegalensis*. *J. Nat. Prod.* 58: 105-108 (1995).

WATANABE, K., FUJINO, H., MORITA, T., KASAI, R. TANAKA, O. Solubilization of saponins of *Bupleri radix* with Ginseng saponins: cooperative effect of dammarane saponins. *Planta Med.* 54: 405-409 (1988).

WOLLENWEBER, E. In "The Flavonoids: Advances in Research", Vol. 2, pp. 233-296, Chapman & Hall, London, 1988.

WONG, S.M., KONNO, C., OSHIMA, Y., PEZZUTO, J.M., FONG, H.H.S., FARNSWORTH, N.R. Irisones A and B: two new isoflavones from *Iris missouriensis*. *J. Nat. Prod.* 50: 178-180 (1987).

WRZECIONO, V., MALEEKI, I., BUDZIANOWSKI, J., KIERYLOWICZ, H., ZAPRUTKO, L., BLIMCIK, E., KOSTEPSKA, H. *Pharmazie* 40: 542 (1985).

YEN, M.H., LIN, C.C., CHUANG, C.H., LIN, S.C. Anti-inflammatory and hepatoprotective activity of saikosaponin-f and the root extract of *Bupleurum Kaoi*. *Fitoterapia* 5: 409-417 (1994).

YOSHIDA, T., CHOU, T., MATSUDA, M., YASUHARA, T., YAZAKI, K., HATANO, T., NITTA, A., OKUDA, T. Woodfordin D and aenothetin A, trimeric hydrolyzable tannins of macro-ring structure with antitumor activity. *Chem. Pharm. Bull.* 39: 1157-1162 (1991).

YOSHIKAWA, K., TAKEMOTO, T., ARIMARA, S. Studies on the constituents of Cucurbitaceae plants XV. On the saponin constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Makino (10). *Yak. Zass.* 106: 758-763 (1986) in C.A.106:9264d.

YOSHIKAWA, K., ARIMITSU, M., KISHI, K., TAKEMOTO, T., ARIMARA, S. Studies on the constituents of Cucurbitaceae plants XVIII. On the saponin constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Makino (13). *Yak. Zass.* 107: 361-366 (1987) in C.A.107:130905n.

ZITO, S.W., TIO, C.D. Constituents of *Chrysanthemum cinerariifolium* in leaves, regenerated plantlets and callus. *Phytochemistry* 29: 2533-2534 (1990).

ZOGG, G.C., NYIREDY, S.Z., STICHER, O. Operating conditions in preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC). II. Influence of solvent strength and flow rate of the mobile phase, capacity and dimensions of the column. *J. Liq. Chromatogr.* 12: 2049-2065 (1989).